UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
MAY 26 '56

# EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

T. Perri: Induzione di arti soprannumerari negli Anfibi (particolarmente negli Anuri) mediante sostanze citolitiche 125

*Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports*

G. Büchi, W. S. Saar, and A. Eschenmoser: The Acid Catalyzed Rearrangement of Ambreinolide . . . . . 136
W. Bencze, O. Halpern und H. Schmid: Über die Konstitution der Visnagane und Khellactone aus *Ammi visnaga* L. . . . . 137
S. Winstein, R. Heck, S. Lapporte, and R. Baird: $Ar_1$-5 and $Ar_2$-6 Aryl Participation in Ionic and Free Radical Processes . . . . . 138
H. R. Grunau und H. Studer: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Bianconekalken des Südtessins 141
P. Bois and H. Selye: Inhibition by Food Restriction of the Renal Damage Due to Corticoid-Overdosage . . 144
A. Gast, E. Knüsli und H. Gysin: Über Pflanzenwachstumsregulatoren . . . . . 146
P. E. Pilet: Sur l'apogéotropisme du Phycomyces . . . . . 148
V. Agnihothrudu: Occurrence of Dictyosteliaceae in the Rhizosphere of Plants in Southern India . . . . . 149
Bettina B. Carter and J. C. Harris: Specificity of Anti-RH Serum Inhibition by Lipid Extracts as Determined by Quantitative Nitrogen Assays . . . . . 150
A. A. Bothner-By, R. F. Dawnson, and D. R. Christman: Is Lysine the Source of the Pyridine Ring in Nicotine? 151
J. Alberty und Rita Takkunen: Histaminantagonistische Wirkungen von Adrenochrom-Monosemicarbazon . . 152
J. F. Riley and G. B. West: A. Binding Site for Histamine in Hog Pyloric Mucosa . . . . . 153
E. Rothlin, A. Cerletti, H. Konzett, W. R. Schalch und M. Taeschler: Zentrale vegetative LSD-Effekte . . 154
F. R. Morris, J. Lowenthal, and L. H. Hamilton: Effect of Heparin Pretreatment on Stress-induced Adrenal Ascorbic Acid Changes in the Rat . . . . . 156
E. Solms und J. Bras: Zur Entstehung der Magensalzsäure über einen «Precursor» (Disputandum) . . . . . 157
H. Brodin: Investigation of the Circulation with Fluorescent Substances (Pro Laboratorio) . . . . . 158
R. Rikmenspoel and G. van Herpen: A Microscopic Film of the Movements of Bull Sperm Cells in Dark-field Illumination (Pro Experimentis) . . . . . 160
F. M. Child and D. Mazia: A Method for the Isolation of the Parts of Ciliates (Pro Experimentis) . . . . . 161

*Informations - Informationen - Informazioni - Notes*

Studiorum Progressus: J. M. van Brink et G. A. Ubbels: La question des hétérochromosomes chez les Sauropsidés. Oiseaux . . . . . 162

**Elektronenmikroskope**
**Mikrotome**
**Elektronendiffraktographen**
**Hochspannungsoszillographen**

**Trüb, Täuber · Zürich**

*Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XII/4*

Birkhäuser Verlag, Basel
Ciba AG., Basel
Contoura Photocopying Ltd., London
Ganz & Co., Zürich
E. Mettler, Zürich
Sandoz AG., Basel
Benno Schwabe & Co., Verlag, Basel
Trüb, Täuber, Zürich
Verlag Chemie GmbH., Weinheim/Bergstrasse
Wild Heerbrugg AG., Heerbrugg

---

*Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:*
*Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de poste des pays suivants:*

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Italien | Belgien, Luxemburg | Dänemark | Schweden | Portugal |
| Deutschland | Holland | Norwegen | Finnland | Marokko |

---

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an 36 francs pour la Suisse; pour l'étranger 46 francs. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 36.–, im Ausland sFr. 46.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 36.– per la Svizzera; all'estero sfr. 46.–. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 36.–; other countries sfr. 46.–. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

*Copyright 1956 by Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15, Telephon (061) 24 98 00; Telegrammadresse: Edita Basel*

*Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel*

New, Simple, Efficient, Low-priced
photocopies anything anywhere
including BOOKS and PERIODICALS

**Contoura**

**THE PORTABLE PHOTOCOPIER**
with the **translucent air cushion**

An ingenious American device now manufactured in Britain and offered to scientists and research specialists on the Continent. Wet or dry processing. On-the-spot exposing and prints placed in lightproof envelope for processing later. Fully guaranteed and free trial allowed to institutions and commercial concerns of international standing.

**Quarto** – up to 24 × 20 cms. – £ 14
**Foolscap minor** – up to 37 × 22 cms. – £ 21
**Foolscap major** – up to 37 × 24 cms. – £ 23

Full information from
CONTOURA PHOTOCOPYING LTD.
56 Islington Park St., London N.1, England

EXPERIENTIA
*Sammelmappe*

Diese Mappe hat den Zweck, die Hefte des laufenden Jahrganges zusammenzuhalten, bevor der komplette Jahrgang gebunden werden kann. Die einzelnen Hefte können mittels einer neuartigen patentierten Haltevorrichtung in die Mappe eingeheftet und im Bedarfsfall wieder herausgelöst werden. Mit dieser geschmackvoll in Kunstleder gebundenen Mappe soll dem Übelstand abgeholfen werden, dass einzelne Hefte im Laufe des Jahres verlorengehen und vor dem Einbinden nachbezogen werden müssen. Die Sammelmappe ist so massiv konstruiert, daß sie ihren Dienst auf Jahre hinaus leisten wird.

*Preis in Kunstleder gebunden: Fr. 6.75*

— — — — — — — — — — — — — —

BESTELLSCHEIN

An den BIRKHÄUSER VERLAG, BASEL 10 (Schweiz)
Ich bestelle... Sammelmappe(n) zum Preise von Fr. 6.75

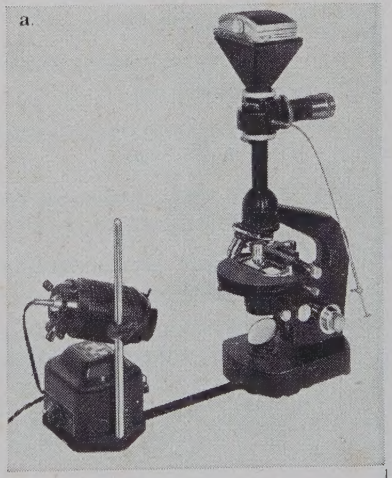
Name: Vorname:

Ort: Strasse:

Bitte in Blockschrift schreiben

**Mikrophotographien besser, einfacher und rascher**

Wild offeriert zwei Ausrüstungen, die bei minimalem Aufwand hervorragende Resultate gewährleisten:




a) Forschungs-Mikroskop Wild M 20 mit Wild-Aufsatzkamera I, Einstellokular, Rollfilmkassette und leistungsfähiger Niedervolt-Mikroskopierlampe.

b) Forschungs-Mikroskop Wild M 20 mit Phototubus, Wild-Aufsatzkamera II, Kleinbildkassette und Einbaubeleuchtung.

**WILD**
**HEERBRUGG**

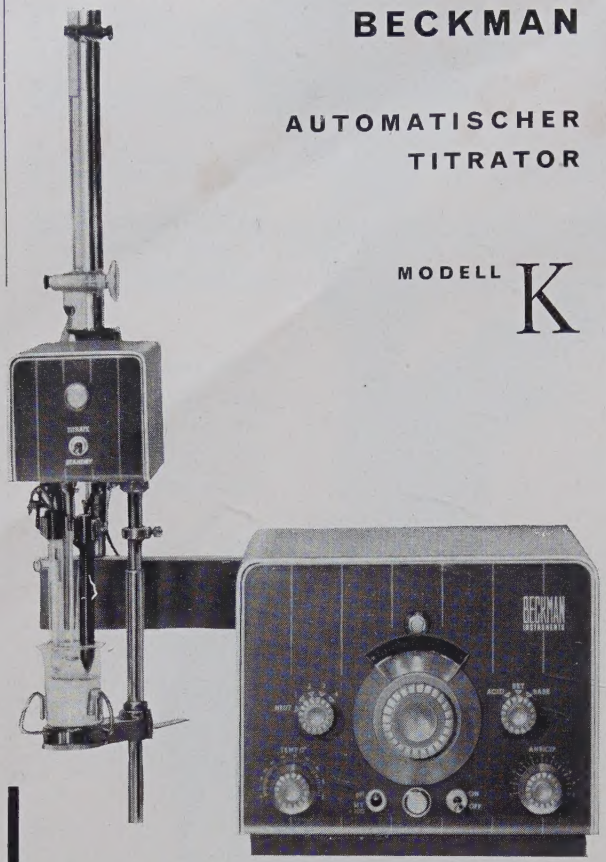
Prospekt Mi 619
kostenlos durch

**Wild Heerbrugg AG.**
**Heerbrugg / Schweiz**

**BECKMAN**

**AUTOMATISCHER TITRATOR**

**MODELL K**



- Universell verwendbar für pH-, potentiometrische und «dead-stop» -Titrationen
- Automatische pH-Stabilisierung in biologischen und bakteriologischen Kulturen
- Bereich: pH 0 bis 14
  ± 600 mV bis ± 1400 mV
- Automatische Steuerung von wahlweise 1 bis 4 Titrationskolonnen
- Einfachste Bedienung. Verriegelung gegen Fehlmanipulationen
- Automatischer Start der Titration beim Einsetzen des Becherglases
- Elektronische Steuerung des Zugabevolumens in Abhängigkeit des Abstandes vom Endpunkt
- Eingebaute Temperatur-Kompensation von 0° bis 100° C
- Solide, korrosionsfeste Ausführung mit zusätzlicher Kapselung hochisolierter Teile

Zuverlässige Beratung und Service
durch eigenes Fachpersonal

**GANZ & CO.**
BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73
*Zürich*

Bitte verlangen Sie BECKMAN-Bulletin 244/E

# Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta

Seit 1943 offizielles Publikationsorgan des Schweizerischen Vereins der Physiologen und Pharmakologen.

Fasc. 4 (1955) enthält folgende Arbeiten:

*J. A. Gutekunst:* Zur Charakterisierung der Hustenstärke durch den Pleuradruck – *M. Dolivo, D. Megirian et A. Fleisch:* L'importance relative des voies nerveuses afférentes dans le «crossed phrenic phenomenon» – *Robert Stämpfli:* Eine neue Methode zur Prüfung des Einflusses gelöster Substanzen auf die Form des Aktionsstroms einzelner markhaltiger Nervenfasern – *J. C. Rüegg:* Untersuchungen am normalen und am chronisch denervierten isolierten Iris-Dilatator mit der Methode der Umströmung – *B. Grüninger:* Vagale Atmungssteuerung aus Zwerchfell und Abdomen – *R. J. H. Oberholzer:* Lokalisation einer Schaltstelle für den Depressorreflex in der Medulla oblongata des Kaninchens – *H. Petsche, A. Marko und M. Monnier:* Mikrozeitliche toposkopische Analyse bioelektrischer Hirnwellen beim Kaninchen – *P. G. Waser, H. Feer und H. Schmid:* Die Verteilung eines bromierten Radio-$C^{14}$-Hydantoins und seiner Metabolite bei Katzen.

Preis des Jahresabonnements:
Fr. 40.–, zuzüglich Porto. Vorzugspreis für wissenschaftliche Institute: Fr. 33.50, zuzüglich Porto.

Abonnementsbestellungen an die Buchhandlungen oder direkt an

BENNO SCHWABE & CO.
VERLAG · BASEL

EXPERIENTIA

Vol. XII - Fasc. 4 Pag. 125–164 15. IV. 1956

# Induzione di arti soprannumerari negli Anfibi (particolarmente negli Anuri) mediante sostanze citolitiche

Di T. PERRI[1], Roma

## 1. *Introduzione*

Sino a qualche decennio addietro, la morfologia causale degli arti si basava essenzialmente su esperienze di trapianti e di rigenerazione. Un nuovo ordine di ricerche cominciò con le esperienze della LOCATELLI[2] negli Urodeli adulti e con quelle del BALINSKY[3] negli embrioni di Tritone: ossia lo studio degli arti soprannumerari da induzione abnorme negli Urodeli.

I risultati del BALINSKY furono riconfermati da altri autori che sperimentarono anch'essi su embrioni di Urodeli mediante trapianto di abbozzi normali; per gli Anuri ne fu ottenuto un caso solo (FILATOW in *Bufo vulgaris*[4]).

Le mie esperienze sull'induzione di arti soprannumerari negli Anuri, i cui primi risultati positivi risalgono al 1946[5], si differenziano da quelle del BALINSKY perchè ho usata l'azione induttiva (stimolante) di sostanze citolitiche. A questo scopo ho eseguito il trapianto sul tronco di embrioni normali allo stadio di bottone codale piccolissimo, di complessi di abbozzi che per essere in particolari condizioni (li asportavo da embrioni röntgenirradiati con dosi nettamente letali) vanno gradualmente in necrosi e gradualmente liberano sostanze citolitiche, le quali sono potenti stimolanti che venendo a contatto con la somatopleura la stimolano ed essa forma lo scheletro di uno o più arti soprannumerari.

Il vantaggio che offre questa tecnica è di poter sperimentare con risultati positivi (il che invece non avviene con le altre tecniche) sugli Anuri, che tra l'altro sono un materiale prezioso sia perchè molto comune, sia per la facilità del loro allevamente e anche, almeno per alcune specie, per la rapidità con cui raggiungono la metamorfosi. È una tecnica in sostanza assai semplice; e i risultati positivi sono in fortissima percentuale. Inoltre sono numerosi i casi in cui gli arti soprannumerari indotti sono conformati assai bene, e questo facilita molto lo studio di varie questioni di morfologia. Varie volte si ha l'induzione di più arti (mentre negli Urodeli furono finora ottenuti solo arti unici), e vedremo come ciò serva alla verifica delle leggi del BATESON.

Più recentemente (ne parlerò nel paragrafo 7) ho iniziato esperienze su embrioni di Tritone per avere un diretto confronto tra i due ordini di Anfibi. Come esperienze di controllo, ho pure eseguito, in *Bufo vulgaris*, trapianti di abbotto di arto tra giovani embrioni.

Tutte le ricerche di morfologia causale degli arti hanno come scopo un approfondimento sia di problemi di biologia generale sia di problemi più propriamente morfologici. Gli arti da induzione abnorme pongono inoltre condizioni nuove, onde problemi propri a queste nuove condizioni, come vedremo nei prossimi paragrafi. Per ora osservo che lo studio degli arti soprannumerari da induzione abnorme negli Anfibi Anuri pone condizioni per vari aspetti differenti che negli Urodeli, in relazione alle peculiarità che esistono nei primi nella conformazione degli arti (e nel piano generale dell'organizzazione scheletrica, muscolare, nervosa, ecc.), peculiarità a loro volta correlate con l'attitudine al salto che si ha negli Anuri e che non si ha invece negli Urodeli.

Lo scopo della presente pubblicazione è di esporre sinteticamente i risultati che ho finora raggiunti, in molti anni di esperienze.

## 2. *Capacità induttive delle sostanze citolitiche*

La tecnica ch'io ho usata (v. fig. 1) consiste essenzialmente nel trapianto di alcune parti (per lo più la parte apicale della testa) di embrioni röntgenirradiati con dosi nettamente letali, sul tronco di embrioni normali, quasi sempre allo stadio di bottone codale piccolissimo. La parte trapiantata, in conseguenza della röntgenirradiazione subìta, va gradualmente in necrosi e in tal modo gradualmente libera i suoi prodotti citolitici. Ha molta importanza il volume del trapiantato, perchè ad un volume maggiore di esso corrisponde una più grande quantità di prodotti citolitici. Sono questi che stimolano la somatopleura con la quale vengono a contatto e la somatopleura, per la sua ben nota competenza artoformativa (v. il paragrafo appresso), dà luogo a uno o più arti soprannumerari.

Si vede subito come la tecnica da me adottata diversifichi notevolmente da quella del BALINSKY e di

[1] Istituto di Anatomia comparata «G. B. Grassi» dell'Università di Roma, diretto dal Prof. G. COTRONEI.

[2] P. LOCATELLI, Arch. ital. de Biol. *74*, 1 (1924).

[3] B. I. BALINSKY, Roux' Arch. Entw. mech. *105*, 718 (1925).

[4] D. FILATOW, Roux' Arch. Entw. mech. *127*, 776 (1933).

[5] T. PERRI, Rend. Accad. naz. Lincei *1* (serie 8ª), 995 (1946).

altri autori (Filatow[6], Glick[7], Choi, ecc.), negli Urodeli, che come stimolo adottarono il trapianto di abbozzi normali, per lo più di quello otico o del placode olfattorio. Tale tecnica (trapianto della vescicola otica) era stata usata dal Balinsky[8] negli Anuri, ma senza risultati positivi.

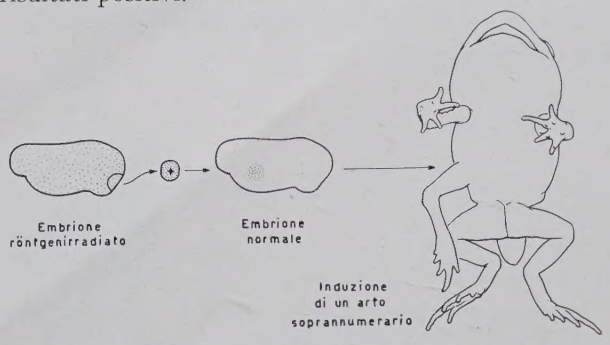



Figura 1. Schema. Da un embrione röntgenirradiato con dosi nettamente letali viene asportata la parte apicale della testa, che viene trapiantata sul tronco di un embrione normale. Il trapiantato va in necrosi e la somatopleura stimolata forma un arto soprannumerario.

Era noto da tempo, particolarmente per le ricerche dell'Haberlandt, che le sostanze citolitiche sono stimolanti della proliferazione cellulare: importanza preponderante si dà ai protidi e ad alcuni prodotti della loro scissione. Per opera del Brachet[9] e della sua scuola si è data grande importanza all'acido ribonucleico. In un mio lavoro[10], a carattere sintetico, sulle capacità induttive dei prodotti di citolisi, conclusi che essi sono potenti attivatori delle attività delle cellule ivi compresa la proliferativa: mi occupai pure[11] dell'importanza dell'acido ribonucleico nell'induzione degli arti soprannumerari.

Da ricordare l'esperienze del Nassonov[12] nelle quali egli, legando un arto di Axolotl così strettamente da determinare istolisi dei tessuti compressi dalla legatura, ebbe lo sviluppo di un arto soprannumerario. Fedotov[13] ottenne arti soprannumerari in Axolotl mediante idrolisati di cartilagine impiantati sotto la cute.

Per avere nei miei casi una dimostrazione diretta dell'importanza della röntgenirradiazione subìta dal trapiantato, e quindi dell'importanza dei prodotti di citolisi, eseguii il confronto con il trapianto della stessa regione cefalica, partendo però non più da embrioni röntgenirradiati bensì da embrioni normali. In queste condizioni, ossia di trapianto di tessuti non destinati ad andare in necrosi, la capacità di stimolo è presente ma molto meno potente: si hanno infatti induzioni scarsissime e molto atipiche. Altre ricerche che convalidano queste conclusioni, riguardano lo studio dei primi stadi della formazione di gemme soprannumerarie. Infatti nei casi di trapianto di abbozzi röntgenirradiati, si osservano accumoli di cellule mesenchimatiche i quali vengono a costituire gemme di arti; se invece il trapiantato non era röntgenirradiato, allora questi accumoli sono molto scarsi e a volte vi sono pochissime cellule mesenchimatiche. Risulta inoltre da questo tipo di esperienze, che si ha dapprima la necrosi del trapiantato e successivamente, quando la necrosi è già in atto o in gran parte già compiuta, inizia la costituzione delle gemme soprannumerarie di arto. Si tenga presente che è con la necrosi che le cellule liberano il loro acido ribonucleico.

In più recenti richerche (Perri e Notarnicola[14]) si è visto che anche negli Urodeli il trapianto della parte apicale della testa ha dato risultati di gran lunga migliori quando proveniva da embrioni röntgenirradiati anzichè da embrioni normali.

Risultata così chiaramente provata la capacità stimolatrice delle sostanze citolitiche, vediamo se vi abbia importanza la causa che provoca la necrosi del trapiantato. Ricordo che l'induzione di arti soprannumerari l'ottenni pure mediante il trapianto, sul tronco di embrioni normali di *Bufo vulgaris*, di complessi di abbozzi cefalici asportati da embrioni ibridi letali *Bufo viridis* ♀ × *Bufo vulgaris* ♂, i quali abbozzi andarono distrutti interamente o in gran parte.

Adunque non ha importanza la causa che porta in necrosi il trapiantato, l'importante è che la liberazione delle sostanze citolitiche sia graduale e in notevole quantità (sufficiente volume del trapiantato). Nelle mie ricerche ho preferito usare la röntgenirradiazione, perchè tecnica assai semplice e che dà, come ho già detto nell'Introduzione, risultati positivi numerosissimi, a volte fino al 100% dei casi come ebbi in qualche gruppo di esperienze in *Bufo vulgaris*.

### 3. *Competenza artoformativa della somatopleura*

Lo Spemann[15] distingueva, nel sistema induttivo, il sistema attivo dal sistema reagente. Questo sistema reagente, il cui concetto risale ormai a molti decenni addietro, è ciò che oggi chiamasi, più comunemente, «competenza».

La somatopleura che sta tra gli arti normali ha, com'è noto, una latente capacità (o competenza) a formare arti. Furono proprio le ricerche del Balinsky sugli arti soprannumerari negli Urodeli, che posero in evidenza una così insospettata estensione della somatopleura che ha questa competenza.

Nel paragrafo precedente ho parlato dello stimolo. Quando questo è abbastanza intenso e nel suo campo

[6] D. Filatow, Roux' Arch. Entw. mech. *110*, 1 (1927).
[7] B. Glick, Anat. Rec. *48*, 407 (1931).
[8] B. I. Balinsky, Roux' Arch. Entw. mech. *110*, 63 (1927).
[9] J. Brachet, *Embryologie chimique* (Masson, Paris 1947); in: *Acidi nucleici, proteine e differenziamento normale e patologico* (Rosenberg e Sellier, Torino 1949), pag. 1.
[10] T. Perri, Ricerca Scientifica *21*, fasc. 7 (1951).
[11] T. Perri, Rend. Accad. naz. Lincei 7 (serie 8ª), 158 (1848); *8* (serie 8ª), 394 (1950).
[12] N. V. Nassonov, Roux' Arch. Entw. mech. *121*, 639 (1930).
[13] D. M. Fedotov, Nature *158*, 367 (1946).
[14] T. Perri e L. Notarnicola, Rend. Accad. naz. Lincei *17*, (serie 8ª), 77 (1954).
[15] H. Spemann, *Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung* (Springer, Berlin 1936).

d'azione vi è la somatopleura, si ha che questa estrinseca la sua competenza artoformativa.

Occorre ora esaminare tale competenza della somatopleura, studiandone partitamente i vari aspetti che ho potuto riscontrare negli Anuri e che porrò in comparazione con quanto si osserva negli Urodeli, in base alle osservazioni del BALINSKY nonchè a quelle da me recentemente raccolte.

Anzitutto anche negli Anuri, come negli Urodeli, tutta la somatopleura che sta tra gli arti ha competenza artoformativa. Tale competenza non è uguale in tutta la somatopleura, ma presenta variazioni qualitative e quantitative, a seconda della zona considerata ossia a seconda che questa zona sia più o meno vicina all'arto normale anteriore o al posteriore.

Le differenze qualitative consistono nel fatto che una parte della somatopleura ha competenza a dare arti anteriori e l'altra a dare invece arti posteriori. (La qualità della lateralità, ossia il trattarsi di arti di lateralità destra o sinistra, è una questione a sè stante che esaminerò al paragrafo 5). BALINSKY[16] aveva osservato – negli Urodeli – che vi è una zona anteriore che dà arti anteriori e una zona posteriore che li dà posteriori, e che le due zone parzialmente si sovrappongono. Negli Anuri ho osservato che in un po' meno della metà anteriore del tronco si hanno arti anteriori oppure atipici però mai (e questo è l'importante) arti posteriori; nella metà (presso a poco) posteriore del tronco si hanno arti posteriori o atipici, però mai anteriori; nella zona intermedia alle due precedenti gli arti indotti possono essere sia anteriori che posteriori, ma più frequentemente sono atipici. È molto interessante notare[17] che alla somatopleura che dà arti posteriori, corrisponde, nella colonna vertebrale, quella parte le cui vertebre sono suscettibili (competenti) di sacralizzazione. Osservo infatti che in esperienze in Anuri di trapianto di abbozzo di arto, l'HODLER[18] ottenne, al massimo, la sacralizzazione della 6ª vertebra; io ottenni, come massimo, la sacralizzazione della 5ª. Si consideri ad esempio il caso della figura 2: per l'arto soprannumerario anteriore il centro della testa omerale giace su un piano trasversale passante per il processo trasverso della 4ª vertebra; mentre per l'arto soprannumerario posteriore il centro della testa femorale è su un piano trasversale che passa per il processo trasverso della 6ª vertebra. Come si vede ciò convalida quanto ho detto sopra.

Per le variazioni quantitative della competenza artoformativa della somatopleura, si osserva anzitutto che la facilità con cui si hanno arti soprannumerari non è la stessa in tutta la sua estensione. Il BALINSKY[16] trovò negli Urodeli che il massimo di frequenza si ha in corrispondenza del 6° segmento, ossia in una zona un po' più vicina agli arti anteriori che ai posteriori.

[16] B. I. BALINSKY, Roux' Arch. Entw. mech. *130*, 704 (1933).
[17] T. PERRI, Arch. ital. Anat. Embr. *48*, 186 (1953).
[18] F. HODLER, Rev. suisse Zool. *56*, 747 (1949).

Nelle mie ricerche è emerso che negli Anuri il massimo di frequenza e la maggiore tipicità dell'indotto (questi due fatti vanno insieme) si ottengono nel terzo posteriore del tronco, viene poi il terzo anteriore e infine il terzo medio. Ciò avevo osservato, e lo notai esplicitamente, mediante il trapianto della parte apicale della testa. Ma molto più chiaramente potei notare tale differente suscettibilità mediante il trapianto della regione branchiale di embrioni röntgenirradiati[19]. Questo trapianto si è mostrato, nelle mie esperienze, dotato di una potenza di stimolo nettamente inferiore (qualunque ne sia la causa) che nel trapianto della parte apicale della testa. Orbene, il trapianto della regione branchiale si è manifestato capace d'indurre arti soprannumerari solo nel terzo posteriore del tronco. Si ha così la prova, come dicevo sopra, della differente suscettibilità della somatopleura a seconda della regione del corpo cui appartiene. Può darsi (è un'ipotesi) che ciò sia correlato con le notevolissime differenze di lunghezza e di volume che si hanno negli Anuri tra arti anteriori e arti posteriori.

Figura 2. *Bufo vulgaris*. Induzione sul lato destro del tronco di un arto soprannumerario anteriore di lateralità sinistra, e di un arto soprannumerario posteriore duplice di cui il componente più cefalico è di lateralità destra e l'altro di lateralità sinistra. Chiaro esempio di simmetria speculare tra gli arti. L'arto soprannumerario anteriore era dotato di mobilità (disegno). (Da T. PERRI, Memorie Accad. naz. Lincei, 1951.)

Vi è un aspetto[19] delle variazioni della competenza artoformativa che è tipico per gli Anuri: riguarda la lunghezza degli arti indotti. È ben noto che negli Anuri, in armonia con la loro attitudine al salto, gli arti posteriori hanno una lunghezza di gran lunga maggiore che gli anteriori. Orbene, osservando la lunghezza massima che hanno nei miei casi gli arti a seconda del livello dove vennero indotti, si nota che la loro lunghezza va aumentando man mano che ci si allontana dagli arti normali anteriori per avvicinarci ai normali posteriori: in vicinanza di questi ultimi si hanno gli arti soprannumerari più lunghi, anche pressochè uguali a un normale arto posteriore. Adunque la lunghezza massima di un arto indotto è in funzione del posto dove esso viene indotto. Per i necessari confronti si noti che nulla di simile è stato notato nei tritoni ove, si ricordi, non esistono marcate differenze di lunghezza tra arti anteriori e posteriori. A maggior chiarimento

[19] T. PERRI, Riv. Biol. *44*, 181 (1952).

riferisco che in esperienze in *Bufo vulgaris* di trapianto[20], allo stadio di giovane embrione, dell'abbozzo dell'arto posteriore in vicinanza dell'abbozzo del normale arto anteriore, ho osservato che l'arto trapiantato si sviluppa di lunghezza pressochè uguale a quello di uno normale posteriore. Adunque la lunghezza di un arto (similmente a quanto erasi visto sopra per la natura di arto anteriore o posteriore) è una caratteristica della competenza della zona di somatopleura che dà l'arto, sia che trattisi di arto normale (esperienze di trapianto) che di arto indotto.

Il valore della competenza risulta inoltre dalle ampie variazioni di essa a seconda della specie nella quale si esperimenta[21]. Tra gli Anuri che ho finora esaminati, il maggior numero, non solo come numero assoluto ma anche come percentuale, di casi positivi d'induzione l'ottenni in *Bufo vulgaris*, ove, in alcuni lotti di esperienze, ebbi si può dire sino al 100% di casi positivi. Inoltre, proprio in questa specie osservai gli arti soprannumerari meglio conformati. Risultati scarsissimi ebbi finora in *Bufo viridis*. Negli ibridi vitali *Bufo vulgaris* ♀ × *Bufo viridis* ♂ ebbi finora 4 casi di arti soprannumerari ben conformati[22]. Buoni risultati ebbi in *Hyla arborea*. Qualche caso l'ottenni – su poche esperienze – in *Discoglossus pictus*. Una specie nella quale non ebbi mai risultati positivi è *Rana esculenta*, pur avendovi usata la stessa tecnica. Non ebbi neppure risultati possitivi in *Rana agilis*, ma per questa specie ho eseguito poche esperienze.

Poichè la mancata induzione può dipendere sia da mancanza (o scarsezza) di competenza, sia da scarsa intensità dello stimolo usato, per risolvere la questione eseguii esperienze di trapianto della parte apicale della testa di embrione röntgenirradiato di *Rana esculenta* su embrione di *Hyla arborea*, ed ebbi in vari casi l'induzione di arti soprannumerari; invece nel trapianto inverso (ossia da embrione röntgenirradiato di *Hyla arborea* su embrione normale di *Rana esculenta*) non ottenni mai casi positivi: ciò mostra chiaramente che in *Rana esculenta* la non induzione di arti soprannumerari dipende solo da una mancanza o deficienza di competenza. Perri e Notarnicola[14] hanno recentemente mostrato che anche in *Triton* si possono avere arti soprannumerari mediante il trapianto di abbozzi röntgenirradiati di *Rana esculenta*[23].

Oltre alle variazioni a seconda della specie usata vi sono variazioni della competenza della somatopleura a seconda dello stadio nel quale si esegue l'esperimento. Esperienze compiute in *Bufo vulgaris* sia da me[24] che dalla Dei[25] hanno mostrato che la competenza artoformativa è ancora presente nella seconda metà della vita embrionale e precisamente nello stadio corrispondente al no. 21 delle tavole dello sviluppo normale di *Rana pipiens* secondo Shumway[26]; con la tecnica da me usata tale competenza in embrioni più avanzati non si è più manifestata. Per gli opportuni confronti si tenga presente che in *Triton* (Balinsky[27]) la competenza artoformativa termina a embrione avanzato. In *Discoglossus pictus* (Mistretta, di questo stesso Istituto) la competenza è ancora presente all'inizio della vita larvale (larva nel senso del Cotronei[28], ossia quando inizia l'alimentazione esterna). Per quanto riguarda l'inizio della competenza artoformativa, ricordo che in *Bufo vulgaris* è possibile il trapianto dell'abbozzo dell'arto, con successivo ottimo sviluppo, anche allo stadio di bottone codale piccolissimo, e quindi in tale stadio è già presente la detta competenza.

### 4. *Morfologia degli arti indotti (sviluppo delle articolazioni, processi regolativi e interdipendenza tra cinto ed arto libero)*

L'esame in toto e l'esame microscopico dei miei casi d'induzione negli Anuri hanno posto in evidenza che gli arti soprannumerari presentano una tipicità molto differente nei vari casi. La tipicità dipende sia dalla soglia della competenza della somatopleura, sia dalla potenza dello stimolo usato. Da casi con formazione di semplici cartilagini d'impossibile identificazione si giunge, attraverso tutti i gradi di passaggio, ad arti con lo scheletro pressochè normale.

In questi casi di maggior tipicità, sia per gli arti anteriori che per i posteriori, possono essere presenti tutte le parti scheletriche sia dell'arto libero che dell'emicinto, così come può essere deficiente qualche singola parte. L'articolazione tra emicinto e stilopodio è perfettamente conformata (v. figura 3) nei casi di arti soprannumerari dotati di mobilità (v. paragrafo 6) e lo può essere, per quanto è dato vedere all'esame microscopico (v. figura 4), nei casi di arti bene o discretamente conformati ma rigidi, e quindi in assenza di qualunque funzione.

Gli arti soprannumerari possono essere negli Anuri sia uno che più: in un caso ne ebbi cinque. Per la genesi dell'induzione di più arti oppure di arti parzialmente duplici o anche triplici, ricordo che dalle ricerche da me eseguite sui primi stadi di sviluppo[29] delle gemme soprannumerarie è risultato che si possono avere

[20] T. Perri, Riv. Biol. *47*, 1 (1955).

[21] T. Perri, Rend. Accad. naz. Lincei *12* (serie 8ª), 753 (1952); *14* (serie 8ª), 845 (1953).

[22] T. Perri, Mem. Accad. naz. Lincei *3* (serie 8ª), fasc. 2, sez. III (1951); Arch. Zool. ital. *39*, 109 (1954).

[23] Questa mancanza o deficienza di competenza in *Rana esculenta* non è in contradizione con il fatto che furono osservati in natura numerosi esemplari di questa specie portatori di arti soprannumerari. Si tende a considerare questi reperti in nature come causati da duplicazione o triplicazione di arti normali già in sviluppo (v. T. Perri, Rend. Accad. naz. Lincei *12* (serie 8ª), 753 (1952).

[24] T. Perri, Rend. Accad. naz. Lincei *14* (serie 8ª), 845 (1953); Arch. Zool. ital. *39* (1954).

[25] L. Dei, Riv. Biol. *46*, 193 (1954).

[26] In R. Rugh, *Experimental embryology* (Burgess Publishing Company, Minneapolis 1948).

[27] B. I. Balinsky, Roux' Arch. Entw. mech. *136*, 250 (1937).

[28] G. Cotronei, Arch. Zool. ital. *10*, 85 (1922).

[29] T. Perri, Mem. Accad. naz. Lincei *3* (serie 8ª), fasc. 2, sez. III (1951).

condizioni varie. Si possono osservare (lasciando da parte i casi di gemme singole) sia più gemme separate, sia gemme tra loro molto vicine o a contatto; in altri casi si notano gemme con due apici, ossia gemme che con ogni probabilità tendono a sdoppiarsi.

Lo sviluppo degli arti soprannumerari è sempre un po' ritardato rispetto a quello degli arti normali.

Per quanto riguarda la questione della regolazione o meno, ricordo che gli arti (arti liberi) sono considerati, sia negli Urodeli che negli Anuri, come sistemi regolativi. Negli embrioni di Urodelo il cinto anteriore è considerato tipicamente a mosaico, mentre i casi di sdoppiamento depongono per la regolazione; nel cinto posteriore si osservano fatti regolativi abbastanza estesi. Negli Anuri si è parlato di cinti regolativi. Da molti è ammesso che trattisi, in sostanza, di coesistenza di fatti sia regolativi che a mosaico. È per quest'ultima interpretazione che depongono i casi da me osservati negli Anuri.

Ancora più interessante mi pare la questione della generalmente ammessa indipendenza tra cinto e arto libero. Tale indipendenza, per gli arti indotti di Urodelo, fu ampiamente ribadita dal BALINSKY[30] (v. paragrafo 7). Nei miei casi d'induzione negli Anuri, ho avuto sia arti liberi in assenza di emicinto, sia (però solo in due casi) emicinti posteriori senza corrispondente arto libero. Debbo però notare che tale indipendenza ha dei limiti, nel senso che ad un arto libero bene sviluppato corrisponde sempre un emicinto anche se non conformato ugualmente bene. Ribadisco che questo l'ho notato sia per gli arti anteriori che per i posteriori.

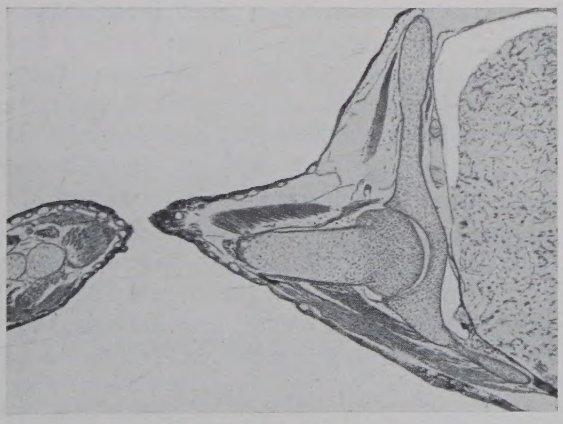


Figura 3. Lo stesso caso della figura 2. Emicinto dell'arto soprannumerario anteriore con la parte prossimale dell'omero. Più all'esterno una sezione dello zeugopodio dello stesso arto (microfotografia).

A conclusione di quanto ho detto sia per la regolazione che per l'interdipendenza tra emicinto ed arto libero, desidero ripetere quanto già dissi in altri lavori, che cioè ai criteri sinora seguiti per la valutazione delle capacità regolative, se ne può aggiungere un altro che emerge dalle mie ricerche sugli arti indotti. Il fatto cioè che in ogni parte della somatopleura può indursi un arto completo (arto libero ed emicinto), implica che l'intero complesso arto-cinto è, negli Anuri, un sistema essenzialmente regolativo.

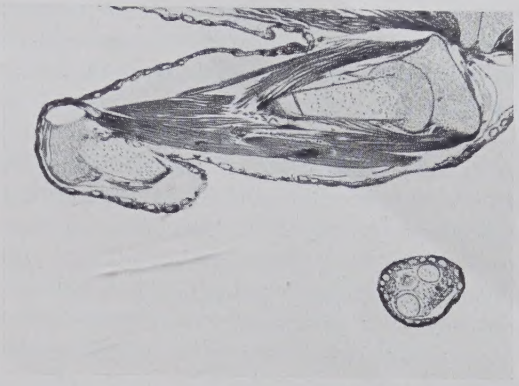


Figura 4. *Bufo vulgaris*. Induzione di un arto soprannumerario posteriore: emicinto, femore, e zeugopodio (microfotografia).

Ho parlato sopra dello scheletro e delle articolazioni degli arti indotti. Per quanto riguarda la muscolatura, questa può essere più o meno abbondante, spesso è scarsissima o anche praticamente assente. Da notare che mentre si può avere lo scheletro dell'arto quasi senza muscolatura, invece non ho mai osservato formazioni muscolari soprannumerarie in assenza dello scheletro dell'arto. Perciò la parte scheletrica dell'arto deve considerarsi come l'induttore della parte muscolare. Alla muscolatura si accompagna l'innervazione, esistendo uno stretto rapporto tra la quantità dell'una e dell'altra.

### 5. *Verifica delle leggi di simmetria speculare del* BATESON

Nelle mie ricerche sugli arti soprannumerari negli Anuri, ho sempre esaminato la loro lateralità e quindi la simmetria tra l'arto indotto ed il vicino arto normale; e, nei casi di arti soprannumerari multipli, la simmetria tra gli arti indotti nonchè la simmetria tra l'arto normale ed il soprannumerario ad esso più vicino.

Esaminai quindi, nelle particolari condizioni degli arti indotti negli Anuri, la verifica o meno delle leggi di simmetria speculare del BATESON[31]. Queste stabiliscono, essenzialmente, che le appendici (compresi gli arti) soprannumerarie osservate in natura sono solitamente due; che vi è tra esse simmetria speculare, e che vi è simultaneamente simmetria speculare tra l'appendice normale e l'appendice soprannumeraria ad essa più vicina. L'HARRISON[32] modificò ed ampliò queste leggi: egli enuncia, in sostanza, che due appendici (arti) sono tra loro in simmetria speculare. Per l'HARRISON i due arti sono di solito un arto trapiantato, la cui

[30] B. I. BALINSKY, Roux' Arch. Entw. mech. *116*, 604 (1929); *130*, 704 (1933).

[31] W. BATESON, *Materials for the Study of Variation* (Macmillan, London 1894).

[32] R. G. HARRISON, J. Exper. Zool. *32*, 1 (1921).

lateralità dipende dall'orientamento del suo asse antero-posteriore, e un arto accessorio che spesso si sviluppa insieme con esso. Si noti quindi che all'arto normale preso in considerazione dal Bateson corrisponde, nell'ampliamento dell'Harrison, un arto trapiantato. Le leggi della simmetria speculare (enantiomorfismo) ebbero ampie riconferme non solo (Przibram[33]) in altre raccolte assai estese di formazioni soprannumerarie trovate in natura, ma anche per gli arti accessori che si osservano in esperienze di trapianto di arti (Harrison, Swett[34], ed altri); vi è poi la classica riconferma di Della Valle[35] nel suo caso di rigenerazione tripla in un arto di Tritone. Per gli arti da induzione abnorme il Balinsky, che negli Urodeli ottenne solo arti unici, concluse (1933)[16] che essi sono, pur con eccezioni, disarmonici e diede importanza al diverso accrescimento delle due facce della gemma (la faccia che guarda caudalmente e quella che guarda cefalicamente), ossia alla posizione che veniva assunta dal suo asse antero-posteriore.

Ricordo che secondo la terminologia dell'Harrison un arto dicesi armonico se la sua lateralità è la stessa del lato del corpo su cui giace (un arto destro, ad esempio, che sia sul lato destro del corpo); dicesi disarmonico se è di lateralità opposta (un arto destro che sia sul lato sinistro del corpo).

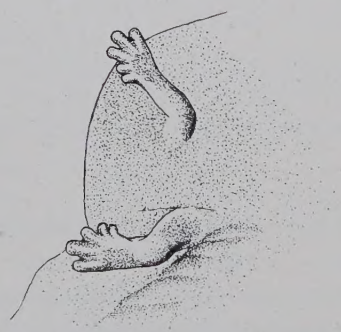


Figura 5. *Hyla arborea*. Induzione, sul lato sinistro del corpo, di un arto soprannumerario posteriore di lateralità destra, in piena simmetria speculare con il vicino arto normale posteriore (disegno).

Per i miei casi di arti soprannumerari negli Anuri (sorvolo sui casi ottenuti in *Triton*, v. paragrafo 7, essendo per questo aspetto in numero insufficiente) tengo qui conto di tutti quelli in cui sia ben riconoscibile non solo la natura di arto anteriore o posteriore, ma anche la lateralità. Nell'accertamento di questa mi sono basato sull'autopodio; rammento che solo in qualche singolo caso gli altri due segmenti dell'arto sono di lateralità opposta. Sono quasi tutti casi portati sino alla metamorfosi; solo qualcuno è a larva sufficientemente avanzata. Unisco ai 45 casi raccolti in un mio lavoro sull'argomento (1953)[36] quelli osservati successivamente sia da me che dalla Dei[25] che in questo stesso Istituto usò la mia tecnica. Sono complessivamente 72 casi, tutti in Anuri, in grandissima maggioranza ottenuti in *Bufo vulgaris*.

Figura 6. *Bufo vulgaris*. Induzione, sul lato destro del corpo, di un arto soprannumerario anteriore di lateralità sinistra, in piena simmetria speculare con il vicino arto normale anteriore (disegno).

I casi di arti posteriori soprannumerari unici sono 35. Di essi 24 sono disarmonici (v. fig. 5). Vi sono 8 casi di arti soprannumerari armonici. Altri 3 casi (descritti dalla Dei) sono pure armonici: però in essi si ha che il vicino arto normale si è sviluppato duplice con un componente armonico e l'altro (il più vicino al soprannumerario) disarmonico, sicchè in realtà questi 3 casi rappresentano una bella verifica delle leggi del Bateson. Adunque nel caso di arti soprannumerari unici, le leggi del Bateson si sono verificate in ben 27 casi su 35, ossia nel 77% dei casi. Di arti soprannumerari anteriori unici ne ho in tutto 7 casi, dei quali 6 disarmonici (v. figure 6 e 7) e quindi conformi alle leggi del Bateson e 1 armonico: anche questi adunque seguono le stesse leggi che gli arti posteriori. Interpreto questi risultati (v. appresso) nel senso che l'arto normale imprime, nello sviluppo, una lateralità opposta al vicino arto soprannumerario.

Vediamo ora la simmetria speculare negli arti soprannumerari multipli, tanto che siano arti anteriori che posteriori. In alcuni casi trattasi di due arti che possono costituire una «coppia di arti»; a volte trattasi di duplicazioni parziali. Vi sono inoltre pochi casi con tre arti soprannumerari tra loro indipendenti, oppure sono triplicazioni parziali: in questi casi la simmetria speculare va esaminata tra due arti contigui. Debbo

[33] H. Przibram, Arch. Entw. mech. *48*, 205 (1921).
[34] F. H. Swett, J. Exper. Zool. *44*, 419 (1926).
[35] P. Della Valle, Boll. Soc. natur. Napoli *25* (1911–1912).
[36] T. Perri, Arch. Zool. ital. *38* (1953); Rend. Accad. naz. Lincei *14* (serie 8ª), 563 (1953).

notare a proposito delle formazioni soprannumerarie plurime, che non sempre i vari componenti di una stessa formazione sono ugualmente conformati: può avvenire che di due arti uno lo sia molto bene e invece l'altro sia atipico. Non bisogna vedere in questo, e l'ho già detto in precedenti pubblicazioni, una mancata verifica delle leggi del Bateson, perchè il realizzarsi di una buona conformazione dipende da vari fattori che si succedono nello sviluppo e anche, ad esempio, dal fatto che due gemme che derivino da due zone vicine di somatopleura (v. il paragrafo 4) abbiano diverso volume, il che può dipendere sia da diversa intensità di stimolo tra le due zone, sia dalla posizione o vicinanza di queste due zone rispetto all'arto normale. A conferma di ciò si tenga presente che di due arti soprannumerari il meglio conformato è quasi sempre quello più vicino all'arto normale, e ho già detto che la somatopleura è più suscettibile nelle sue parti più vicine all'arto normale.

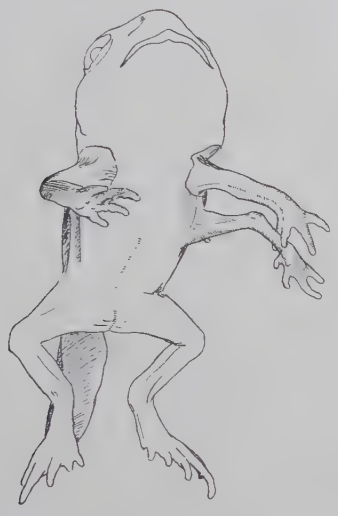


Figura 7. *Bufo vulgaris*. Induzione, sul lato sinistro del corpo, di un arto soprannumerario anteriore di lateralità destra, in piena simmetria speculare con il vicino arto normale anteriore (disegno).

Per quanto riguarda la simmetria tra gli arti soprannumerari, i due arti delle formazioni duplici, o due arti consecutivi di una formazione plurima, sono stati tra loro in simmetria speculare in 19 casi su 19, ossia senza nessuna eccezione. Sono risultati assai interessanti, perchè dànno una chiara dimostrazione dell'esistenza di una dominanza, per quanto riguarda la lateralità, di un arto su un altro. Vedremo tra poco quale di questi due arti sia quello che imprime all'altro una lateralità opposta.

Per la simmetria tra l'arto normale ed il soprannumerario ad esso più vicino, osservo che negli ora detti 19 casi si è avuto quasi sempre (in 17 casi su 19) che il componente più vicino all'arto normale è pure con questo in simmetria speculare; si è quindi avuta la successione: arto normale (armonico), arto soprannumerario disarmonico, arto soprannumerario armonico. Ho poi altri 11 casi nei quali dei due arti soprannumerari solo in uno è chiara la lateralità, e precisamente in quello più vicino all'arto normale in 9 casi, e in quello più lontano negli altri 2. Orbene nei primi 9 casi si è avuta simmetria speculare tra l'arto normale ed il vicino soprannumerario, cioè la successione: arto normale (armonico), arto soprannumerario disarmonico, arto soprannumerario atipico. Negli altri 2 si è avuta la successione: arto normale (armonico), arto soprannumerario atipico, arto soprannumerario armonico: non mi pare che questi due casi possano considerarsi in contraddizione con le legge del Bateson, a causa dell'atipia del primo arto soprannumerario. La simmetria speculare tra l'arto normale ed il soprannumerario ad esso più vicino mostra che questo arto soprannumerario si comporta di regola (26 casi su 28, ossia nel 92,5% dei casi) come fosse un arto unico, ossia subisce, come tutto lascia ritenere, l'azione dominante dell'arto normale. L'arto soprannumerario più vicino al normale domina a sua volta (in tutti i casi finora osservati) sull'altro arto soprannumerario imprimendogli una lateralità opposta.

Questa interpretazione basata sulla teoria della dominanza fisiologica del Child[37], che l'applicava agli arti normali, pur essendo una interpretazione, mi pare sia oggi la più accettabile perchè la più aderente ai fatti finora osservati e perchè si addice agli arti sopranummerari sia unici che plurimi. Si è visto infatti che un arto soprannumerario, o che trattisi di un arto unico o che in una formazione plurima sia il più vicino all'arto normale, assume di regola (si è verificato in 59 casi su 70, ossia nell'84,2% dei casi[38]) una lateralità opposta a quella dell'arto normale; il successivo arto soprannumerario (più lontano dal normale), se esiste, ha sempre una lateralità opposta a quella del primo arto soprannumerario. Adunque la capacità ad imprimere una lateralità opposta ad un altro arto va diminuendo gradualmente (segue un gradiente) man mano che ci si allontana dalla zona dell'arto normale. Questa capacità appare, in definitiva, un aspetto quantitativo della competenza artoformativa della somatopleura.

Adunque le leggi di simmetria speculare del Bateson sono, in queste particolari condizioni di arti soprannumerari da induzione abnorme, ampiamente verificate; e le poche eccezioni osservate vanno quindi interpretate come effetto di condizioni secondarie intervenute durante lo sviluppo.

### 6. *Sistema nervoso e mobilità degli arti*

Tra gli arti soprannumerari da induzione abnorme, quelli dotati di mobilità sono rarissimi: negli Urodeli non ne furono osservati, negli Anuri potei descriverne

[37] C. M. Child, *Patterns and Problems of Development* (Univ. of Chicago Press, Chicago 1941).

[38] I 70 casi sono così ripartiti: 42 casi di arti unici, 19 casi di arti multipli con chiara lateralità dei componenti, 9 casi di due arti dei quali solo quello più vicino al normale è di chiara lateralità.

6 casi con mobilità più o meno estesa. Per l'esame delle condizioni che rendono possibile la mobilità, ho esaminato istologicamente in questi ultimi casi – tutti in *Bufo vulgaris* – la conformazione dello scheletro, delle articolazioni, della muscolatura e del sistema nervoso (nervi, gangli spinali, midollo spinale), comparando con quanto si osserva negli arti soprannumerari immobili[39].

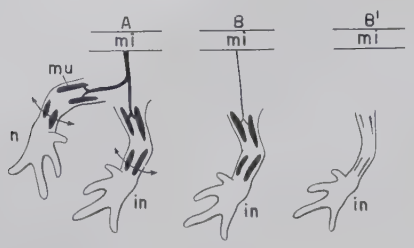



Figura 8. Schema delle connessioni nervose degli arti soprannumerari indotti. È limitato alla parte di midollo spinale(*mi*)corrispondente alla metà anteriore del tronco, dove la somatopleura ha la competenza a dare arti soprannumerari anteriori. In *A* è schematizzato il plesso brachiale che innerva sia l'arto normale (*n*) sia, ed in quantità sufficiente, l'arto indotto (*in*), tra loro in simmetria speculare: i loro movimenti (indicati dalle frecce) sono specularmente simmetrici. In *B* è rappresentato un arto indotto immobile che presenta abbondante muscolatura (*mu*) e innervazione da parte di un tratto di midollo spinale sito caudalmente al tratto brachiale. In *B'* è un arto indotto immobile con muscolatura quasi assente e senza innervazione. (Da T. Perri; Rend. Accad. naz. Lincei, 1954.)

Negli arti soprannumerari mobili la conformazione dello scheletro e delle articolazioni è assai regolare, e la quantità della muscolatura è notevole. Ciò può anche ritenersi ovvio, altrimenti non sarebbe possibile la mobilità. Per quanto riguarda la comparazione con gli arti soprannumerari non dotati di mobilità, è da tener presente che anche in questi scheletro, articolazioni e muscolatura possono essere ben conformati.

Le differenze (v. figura 8) che ho costantemente notate tra arti mobili ed immobili sono nell'innervazione. Negli arti mobili essa è sempre provenuta, o completamente o almeno in parte cospicua, dai normali plessi degli arti; inoltre l'innervazione, come quantità, è stata sempre notevole pur rimanendo inferiore al normale. Negli arti immobili, invece, l'innervazione non proviene affatto, o solo in quantità minima, dai normali plessi degli arti; la quantà d'innervazione è stata più scarsa che nei casi con mobilità.

I gangli spinali corrispondenti alla zona dell'arto soprannumerario sono aumentati di volume; nella regione motoria del midollo spinale non si notano cospicue variazioni in rapporto con l'aumentato campo d'innervazione. Negli arti soprannumerari, indipendentemente sia dalla mobilità che dalla quantità di muscolatura, si possono rilevare fascetti nervosi in rapporto con la loro cute.

[39] T. Perri, Rend. Accad. naz. Lincei *15* (serie 8ª), 463 (1953); *16* (serie 8ª), 118 (1954); *16* (serie 8ª), 291 (1954); Riv. Biol. *47*, 2 (1954).

### 7. *Arti soprannumerari nei Tritoni*

Allo scopo di stabilire una diretta comparazione, tra Anuri ed Urodeli, dei fattori che portano all'induzione di arti soprannumerari, ho iniziato[14] esperienze in *Triton taeniatus* usando come stimolo sostanze citolitiche. La tecnica usata è stata infatti la stessa che per gli Anuri: trapianto, su embrioni normali, della parte apicale della testa di embrioni röntgenirradiati con dosi nettamente letali. Gli embrioni donatori furono di tritone, oppure di *Rana esculenta* e in qualche caso di *Discoglossus pictus*. Il trapianto fu eseguito allo stadio di giovani embrioni, nella zona del tronco dove la somatopleura ha competenza a dare arti anteriori.

La tecnica di usare come sorgente di stimolo sostanze citolitiche, provenienti da un trapiantato che va in necrosi per effetto della röntgenirradiazione subìta, ha dato anche in tritone risultati positivi d'induzione di arti soprannumerari, in alcuni casi ben conformati (v. figura 9). Usando invece gli stessi trapianti, però da embrioni normali (cioè trapianto di tessuti non destinati ad andare in necrosi), i risultati positivi furono scarsissimi.

Figura 9. *Triton taeniatus*. Induzione di un arto anteriore soprannumerario di lateralità destra sul lato destro del tronco (disegno).

L'esame istologico permette di aggiungere che l'emicinto degli arti indotti è costituito, al massimo, da un pezzo cartilagineo con un'incompleta cavità articolare in rapporto con la testa dell'omero; e questo solo in due casi (v. figure 10 e 11), mentre negli altri l'emicinto è stato del tutto rudimentale o addirittura assente.

È qui da ricordare che il Balinsky[40] avendo notato nei suoi casi di arti soprannumerari nei Tritoni, che in corrispondenza degli arti anteriori soprannumerari non vi erano emicinti o questi erano del tutto rudimentali, aveva distinto un mesenchima che forma l'arto libero anteriore da un mesenchima che costituisce il cinto anteriore.

Come ho già accennato nel paragrafo 4, negli Anuri non ho rilevato una tale differenza, perchè in essi si

[40] B. I. Balinsky, Roux' Arch. Entw. mech. *116*, 604 (1929).

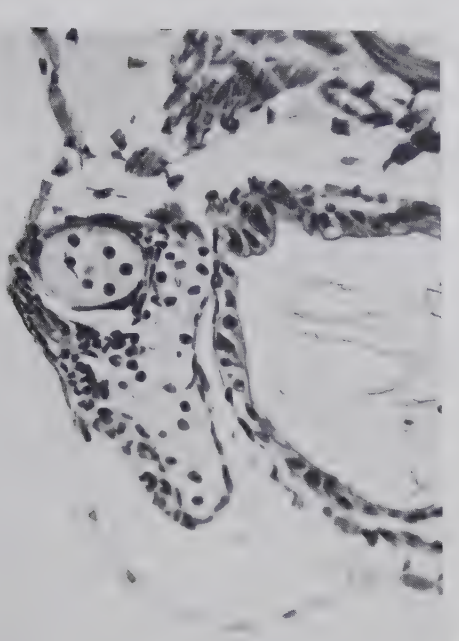


Figura 10. Lo stesso caso della figura 9. Emicinto anteriore incompleto, con cavità glenoidea in rapporto con l'omero (microfotografia).

ottengono, con gli arti liberi sia anteriori che posteriori, emicinti ben conformati sia anteriori sia, rispettivamente, posteriori. Per quanto riguarda gli Urodeli mi pare che con sicurezza si possa dire solo questo, che l'indipendenza tra l'arto libero e l'emicinto è maggiore che negli Anuri. La sperimentazione con sostanze citolitiche non è negli Urodeli abbastanza progredita per decidere quale importanza vi abbia la potenza dello stimolo, ossia per accertare se l'induzione dell'emicinto richieda uno stimolo più forte che l'induzione dell'arto libero. Si tenga presente che nei due casi delle figure 10 e 11, che sono stati i migliori, l'induzione fu ottenuta mediante il trapianto della parte apicale della testa di Anuro (di *Rana esculenta* nel caso delle figure 9 e 10; di *Discoglossus pictus* nel caso della figura 11) röntgenirradiato, il quale trapianto ha mostrato, anche per l'induzione degli arti liberi, una maggiore capacità di stimolo (forse per il maggior volume) che non il corrispondente trapianto da tritone.

Queste ricerche sull'induzione di arti soprannumerari negli Urodeli saranno continuate per una più approfondita comparazione, morfologica e causale, tra gli arti degli Anuri e quelli degli Urodeli.

### 8. *Arti soprannumerari e colonna vertebrale*

Ho già ricordato nell'Introduzione che alla conformazione profondamente diversa degli arti posteriori, a seconda che siano di Anuri oppure di Urodeli, è correlativa una diversa conformazione della colonna vertebrale. Sia le peculiarità degli arti posteriori che quelle della colonna vertebrale degli Anuri sono in armonia con la loro attitudine al salto. Ritenni quindi opportuno dedicare delle ricerche, negli Anuri (sperimentai in *Bufo vulgaris*), alle connessioni tra la colonna vertebrale ed il cinto posteriore[41].

Premetto che nel processo laterale della vertebra sacrale degli Anuri bisogna distinguere una porzione basale (che è un processo trasverso uguale a quello delle altre vertebre) dal rimanente della formazione (che ho interpretato come costa sacrale). Le mie ricerche mi hanno mostrato un'indipendenza di sviluppo del processo laterale (a parte le sua porzione basale) rispetto alla vertebra sacrale. A conferma di ciò osservai, in alcuni casi d'induzione di arti soprannumerari, che l'apice dell'ileo soprannumerario era in connessione con una cartilagine che per la forma e per la connessione stessa con l'ileo interpretai come un processo laterale. Da questa indipendenza del processo laterale (a parte la sua porzione basale) e dal fatto ben noto (DÜRKEN[42], DRAGOMIROWA[43], HODLER[44]) che esso è indotto dall' ileo, ho tratto la conclusione che il processo laterale (a parte la sua porzione basale) della vertebra sacrale appartiene al sistema morfologico dell'arto e dell' emicinto.

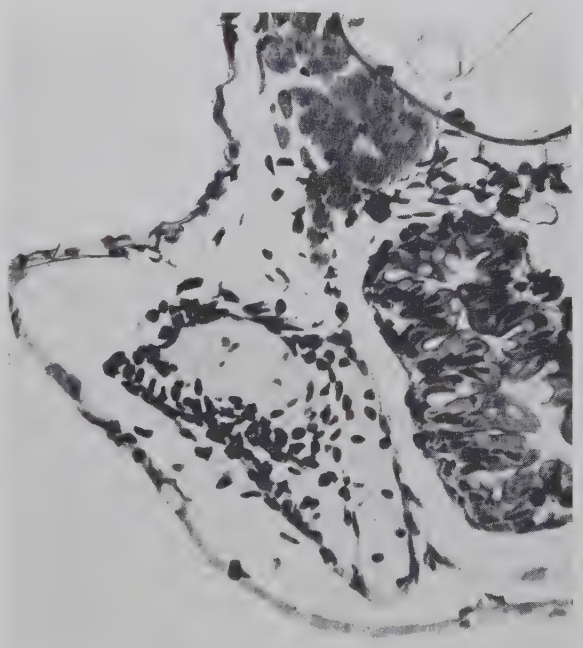


Figura 11. *Triton taeniatus*. Induzione di un arto soprannumerario. Emicinto anteriore incompleto, e parte prossimale dell'omero (microfotografia).

Orbene, la corrispondenza (v. paragrafo 3) tra la parte della somatopleura che ha competenza a dare arti e

[41] T. PERRI, Rend. Accad. naz. Lincei *13* (serie 8ª), 288 (1952); Arch. ital. Anat. Embr. *48*, 186 (1953).

[42] B. DÜRKEN, Z. wiss. Zool. *99*, 189 (1911); *Experimental Analysis of Development* (Norton, New York 1932).

[43] N. DRAGOMIROWA, Zool. Jb. allg. Zool. Physiol. *54*, 249 (1935).

[44] F. HODLER, Rev. suisse Zool. *56*, 747 (1949).

cinti posteriori e la parte della colonna vertebrale che ha competenza alla sacralizzazione, mi sembra di grande interesse perchè convalida, sotto una luce nuova, la stretta correlazione tra arto posteriore e sacralizzazione.

### 9. *Conclusioni*

Come si è visto nel corso del lavoro, la linea direttiva di tutto questo insieme di ricerche che ho eseguito è stato lo studio del complesso induttore-competenza, quale si estrinseca nell'induzione degli arti soprannumerari negli Anuri, e come vari secondo le diverse zone della somatopleura, secondo le specie usate e secondo lo stadio nel quale si esperimenta.

Del complesso induttore-competenza me ne ero già occupato molti anni addietro, nel corso di ricerche sperimentali sull'abbozzo lentogeno, particolarmente (dal 1934) in *Rana esculenta*. Più recentemente mi sono occupato di un parallelo tra le variazioni del complesso induttore-competenza quali si verificano nello sviluppo dell'abbozzo lentogeno e nello sviluppo degli arti[45].

Nel meccanisimo dell'induzione degli arti soprannumerari, lo stimolo è completamente aspecifico, ciò che importa è che abbia una sufficiente intensità. Il trapianto di abbozzi röntgenirradiati con dosi nettamente letali, in modo che vanno in necrosi e così liberano sostanze citolitiche, costituisce una sorgente di stimolo continuo e di notevole intensità.

L'altro fattore è la competenza artoformativa della somatopleura. Poichè lo stimolo usato è del tutto aspecifico, si ha che la specificità dell'indotto sta tutta nella competenza della somatopleura. Perchè questa competenza si estrinsechi è necessario, come sopra ho detto, che l'intensità dello stimolo superi un certo limite o soglia. Orbene, l'altezza di questa soglia varia sia da specie a specie, sia tra Anuri ed Urodeli. La tecnica del trapianto dell'abbozzo otico che negli Urodeli aveva dato risultati positivi (ho più volte ricordata l'amplissima sperimentazione del Balinsky), non aveva invece dato alcuna induzione di arti negli embrioni di Anuri. L'opportunità di avere introdotto in queste ricerche la forte azione stimolante del trapianto di complessi di abbozzi che per essere in particolari condizioni liberano sufficienti quantità di sostanze citolitiche, sta particolarmente nel poter studiare l'induzione di arti soprannumerari negli Anfibi Anuri. Questi, chiamati pure Anfibi saltatori, in armonia con la loro attitudine al salto presentano gli arti (e correlativamente lo scheletro assile, il sistema muscolare, ecc.) conformati in modo profondamente diverso rispetto agli Urodeli, e inoltre presentano gli arti posteriori notevolmente diversi dagli anteriori. Le differenze negli arti esistenti tra Anuri ed Urodeli, si ripetono negli arti soprannumerari a seconda che siano stati indotti in embrioni dell'uno o dell'altro ordine di Anfibi. Siamo nell'ambito del controllo genetico della competenza, di cui troviamo un mirabile esempio nell'esperienza di Spemann e Schotté[15]: nel trapianto di ectoderma indifferente di Anuro su Urodelo si ha che l'Urodelo può indurre nell'ectoderma dell'Anuro una bocca, ma questa avrà tutte le caratteristiche della bocca dell'Anuro. La competenza a dare arti con tutte le caratteristiche di specie non è limitata alle zone degli arti normali, ma si estende a tutta la somatopleura con competenza artoformativa. Così in *Hyla arborea* gli arti soprannumerari ovunque indotti hanno tutte le caratteristiche degli arti di *Hyla arborea*, come è particolarmente agevole accertarsene per le peculiarità delle dita.

Similmente si ha, negli Anuri, che le differenze che si hanno negli arti a secondo che siano anteriori o posteriori, si ripetono negli arti indotti. La somatopleura dà anteriormente arti anteriori, posteriormente arti posteriori: i limiti tra le due zone non sono netti onde può parlarsi di una zona intermedia ove possono aversi sia arti anteriori che posteriori.

È molto interessante notare (osservazioni negli Anuri) che alla parte di somatopleura che ha competenza a dare arti e cinti posteriori, corrisponde la zona di colonna vertebrale che ha competenza alla sacralizzazione. Infatti (v. paragrafo 3) la vertebra più cefalica nella quale si è riusciti negli Anuri a indurre la sacralizzazione è la 6ª (Hodler) e in un mio caso di trapianto persino la 5ª. L'importanza di questa corrispondenza (è inutile che qui ripeta quanto ho già detto nel paragrafo 8) sta nel porre in luce le strette correlazioni tra arti-cinti posteriori e sacralizzazione.

Nella metà posteriore della somatopleura si ha, negli Anuri, una facilità a indurre arti soprannumerari maggiore che nelle parti anteriori. Inoltre nelle zone posteriori gli arti indotti sono di lunghezza maggiore di quelli indotti nelle zone anteriori: gli arti sono tanto più lunghi quanto più la zona ove vengono indotti è vicina al normale arto posteriore, però non ho mai osservato arti indotti che siano stati più lunghi degli arti normali posteriori. Tali differenze di lunghezza negli arti indotti non si hanno invece negli Urodeli, ove (a parte quelli con arti posteriori ridotti o assenti) non vi sono cospicue differenze di lunghezza tra arti anteriori e arti posteriori.

Un altro aspetto della competenza lo abbiamo pure visto a proposito della lateralità degli arti indotti. L'arto normale imprime ad un arto soprannumerario unico (o al soprannumerario più vicino nel caso di arti multipli) una lateralità opposta; e questo arto soprannumerario a sua volta imprime una lateralità opposta al successivo arto soprannumerario (nel caso vi siano più arti soprannumerari). Di due arti soprannumerari, quindi, il dominante nel determinismo della lateralità è quello più vicino all'arto normale. Questa è una interpretazione, ma che è basata su un gran numero di casi.

[45] T. Perri, Ricerca Scientifica *22*, 864 (1952); Riv. Biol. *44*, 181 (1952).

Viene così prospettato che la lateralità degli arti indotti è un aspetto quantitativo della competenza artoformativa della somatopleura.

Ho accennato sopra alla differente suscettibilità della competenza artoformativa della somatopleura a seconda che si tratti di Anuri o di Urodeli. Anche nell'ambito degli Anuri esistono, a tal riguardo, differenze assai ampie da specie a specie. Da *Bufo vulgaris* ove si ottengono con grande facilità arti soprannumerari, si giunge sino a *Rana esculenta* ove finora non sono riuscito ad avere alcun caso positivo.

Molto interessanti sono le variazioni a seconda dello stadio nel quale si esperimenta. In *Bufo vulgaris*, con la tecnica da me usata, eseguendo il trapianto nella seconda metà dello stadio embrionale (dopo lo stadio corrispondente al no. 21 delle tavole dello sviluppo normale di *Rana pipiens* sec. Shumway) non si sono più ottenuti arti soprannumerari. Ecco qui un caso di dissociazione tra lo stimolo, che è quello stesso che in stadi precedenti dava risultati positivi, e la competenza artoformativa che è ora scomparsa o, più probabilmente, è molto diminuita. La stessa dissociazione tra stimolo e competenza si ha pure, ad esempio, in alcuni casi d'induzione dell'abbozzo lentogeno, come ho detto ampiamente in altri lavori.

La mobilità degli arti soprannumerari, che abbiamo visto essere rarissima, è particolarmente in rapporto con il ricevere o meno l'innervazione dai normali plessi degli arti; ed è quindi legata alla possibilità di connessioni nervose con particolari regioni del midollo spinale (intumescenza anteriore o posteriore) che, come tutto lascia ritenere, sono, per la parte motoria, a precoce determinazione.

Come si vede, la concezione del complesso induttore-competenza, con le sue variazioni, ci permette di dare sempre più ordine a tutto un insieme di dati sperimentali e comparati.

*Summary*

By means of cytolytic substances, many supernumerary limbs were induced in anouran amphibians. Cephalic portions of embryos, previously x-irradiated with highly lethal doses, were transplanted on to the trunk of normal embryos at the early tail bud stage. The x-irradiated transplant gradually became necrotic and gave out cytolytic products. These stimulated the somatopleura, with which they came into contact, to produce heaps of mesenchymatic cells, from which the axial portions of one or more supernumerary limbs were formed (see Fig. 1).

Three zones can be distinguished in the somatopleura: an anterior zone, having the competence to form only anterior limbs, a posterior zone, only forming posterior limbs, and a medial zone, forming both anterior and posterior limbs, which are often atypical.

The length of an induced limb, in the anourans is due to the zone of the somatopleura which has induced it; the nearer this zone is to the normal limb zone, the longer the induced limb, which can be as long as the normal limb.

The competence of the somatopleura to form limbs varies according to the species used. The best results were obtained in *Bufo vulgaris*; good results in *Hyla arborea*; and some cases also in *Discoglossus pictus*. No positive case was obtained in *Rana esculenta*. It may be observed that positive cases were obtained using x-irradiated embryos of *Rana esculenta* as donors and embryos of *Hyla arborea* as hosts.

With this technique, the competence to form limbs is seen up to the stage 21 of Shumway's developmental tables of *Rana pipiens*.

The morphological structure of the different parts of the induced limbs shows many variations. In the best cases, the skeleton both of the free limb and of the girdle is almost normal; the joints can be well formed also in non-functioning limbs, the muscles can be well developed and the nerves present. A relative dependance is shown between the girdle and the free limb.

The possibility of obtaining a limb (free limb and girdle) from any zone of the somatopleura between the limbs shows that in the anourans the limb (free limb and girdle) is an essentially regulative system. Bateson's rules of specular symmetry were verified in this condition of induced supernumerary limbs.

Very seldom, and only in *Bufo vulgaris*, were cases of limbs having higher or lower capacity of moving by themselves observed. From the morphological point of view, the moving limbs are distinguished from the others by their well developed innervation coming (at least chiefly) from the normal plexuses of the limbs.

The zone of somatopleura, having the competence to give posterior limbs, corresponds, in the anourans, to the portion of the vertebral column which can be sacralized (up to the 5th vertebra). Recent experiments show that supernumerary limbs can also be obtained in *Triton* by means of x-irradiated transplants.

# Brèves communications - Kurze Mitteilungen
# Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

## The Acid Catalyzed Rearrangement of Ambreinolide* [1]

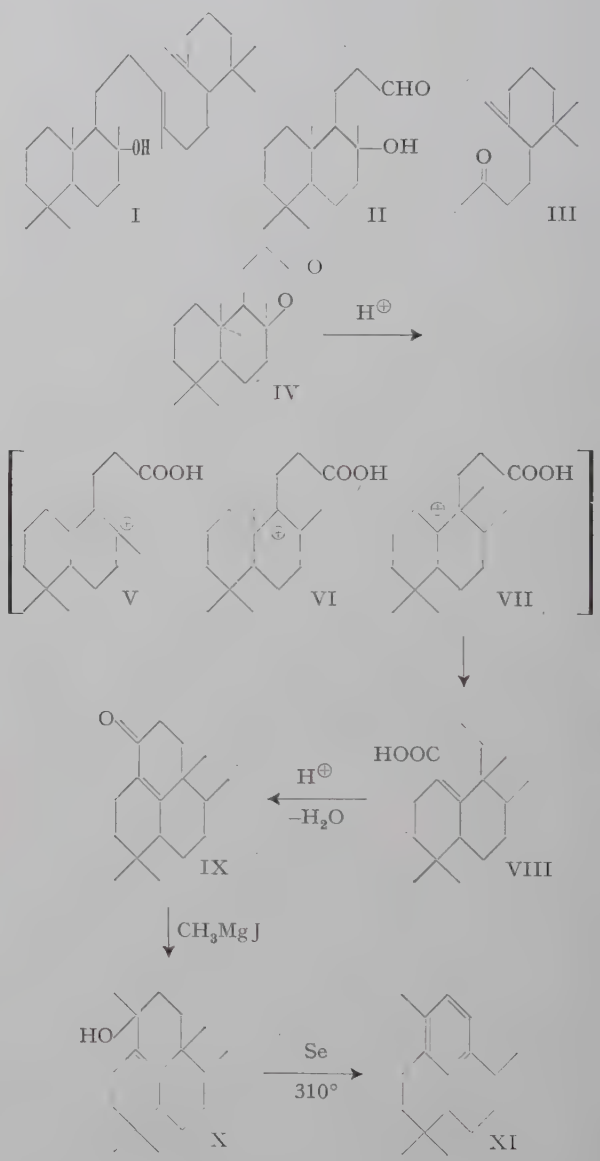
Ambergris, an excretion product of the sperm whale and of considerable importance to perfumery, has been the subject of several chemical investigations during the last decade. The structure of ambrein (I), a constituent of the non-volatile fraction of ambergris, has been elucidated by Ruzicka and Jeger and their collaborators in Zurich and by Lederer and his school in Paris[2]. A chemical analysis of the volatile fraction of ambergris, which is mainly responsible for the odor of the product, has led to the isolation of dihydro-$\gamma$-ionone (III), a ketone, $C_{13}H_{20}O$, of unknown constitution and a hydroxy aldehyde (II), $C_{17}H_{30}O_2$[3]. Noting that all of these naturally occuring substances are products of oxidative degradation of ambrein (I), Lederer has made efforts to develop procedures for converting the odorless ambrein to products with ambergris odor. One of the products isolated by Lederer *et al.*[4] from the acid catalyzed isomerization of ambreinolide (IV), a key degradation product of ambrein, is a tricyclic ketone $C_{17}H_{26}O$,

$$\lambda_{max}^{EtOH} 252\,m\mu\ (\log \varepsilon\ 4\cdot1)$$

which has an odor reminiscent of ambergris. A previous attempt to elucidate the structure of this ketone appears to have been unsuccessful[4] (see Formulae I–XI).

We now wish to report work which establishes the structure of the tricyclic ketone $C_{17}H_{26}O$ as IX. The ultraviolet spectrum of this compound indicates the presence of a tetrasubstituted s-trans-$\alpha,\beta$-unsaturated carbonyl system, and the infrared spectrum (absorption bands at 6·05 and 6·17 $\mu$) points to a cyclohexenone rather than a cyclopentenone structure. The formation of such a ketone from IV can be satisfactorily explained if it is assumed that a Wagner-Meerwein rearrangement is involved in the acid catalyzed reaction. Such a rearrangement has been observed previously in the closely related conversion of dihydroabietic acid to "hydroxytetrahydroabietic acid"[5], and the formation of the tricyclic ketone can then easily be visualized as proceeding through the sequence IV→ VIII→IX.

Inspection of structure IX shows its close similarity to the hydrocarbon (XI), $C_{17}H_{20}$, which has been obtained by dehydrogenation of the diterpenes agathic acid[6] and cativic acid[7]. The structure XI has recently been established by synthesis[8]. In order to prove the proposed structure IX we have carried out the following conversions: A solution of ambreinolide (IV) (2 g) in 20 ml of dioxane containing 30 ml of 80% $H_2SO_4$ was heated at 60° for 1·5 h in an atmosphere of nitrogen,




whereby the tricyclic ketone was isolated in 32% yield. (Analysis calculated for $C_{17}H_{26}O$: C 82·87; H 10·64. Found: C 83·37; H 10·62; $\lambda_{max}$ 251·6 m$\mu$, log $\varepsilon$ 4·07; 6·05 and 6·17 $\mu$.) The compound was characterized by a 2,4-dinitrophenylhydrazone (m.p. 196·5–198°, dec. lit.[4]: 196–200°) a phenylsemicarbazone (m.p. 218·2 to 219·6°, lit.[4]: 215–219°), and a semicarbazone (m.p. 207·1–208·6°, lit.[4]: 123–125°;Analysis calculated for $C_{18}H_{29}ON_3$: C 71·24; H 9·63. Found: C 71·33; H 9·64).

* Terpenes III.

[1] Part II, G. Büchi and R. E. Erickson, J. Amer. chem. Soc. *76*, 3493 (1954).

[2] E. Lederer, *Odeur et parfums des animaux*, in: *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, vol. 6, p. 88 (Springer, Wien) 1950).

[3] L. Ruzicka and C. F. Seidel, Helv. chim. Acta *33*, 1285 (1950). – L. Ruzicka, C. F. Seidel, and M. Pfeiffer, Helv. chim. Acta *31*, 827 (1948).

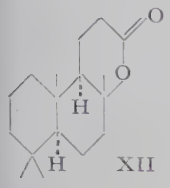
[4] C. Collin-Asselineau, E. Lederer, D. Mercier, and J. Polonsky, Bull. Soc. chim. France 720 (1950).

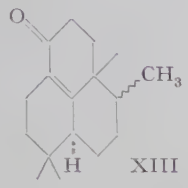
[5] D. H. R. Barton, Chem. and Ind. 638 (1948). – L. A. Subluskey and T. F. Sanderson, J. Amer. chem. Soc. *76*, 3512 (1954).

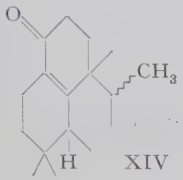
[6] L. Ruzicka and J. R. Hosking, Ann. Chem. *469*, 147 (1929); Helv. chim. Acta *13*, 1402 (1930); *14*, 203 (1931).

[7] F. W. Grant, Jr. and H. H. Zeiss, J. Amer. chem. Soc. *76*, 5001 (1954).

The ketone IX (1·3 g) was allowed to react with excess methylmagnesiumiodide to give the corresponding alcohol (X) (1·2 g). Dehydrogenation of X (820 mg) by heating with selenium (1·2 g) at 310° for 19 h yielded 205 mg of XI. ($\lambda$ max./cyclohexane 233, 283, 294, 328 m$\mu$, log $\varepsilon$ 4·51, 3·57, 3·49, 3·05. Picrate, red needles m.p. 135–136°, lit.[8]: 135·5–136·0. Analysis calculated for $C_{23}H_{23}O_7N_3$: C 60·92; H 5·11. Found: C 60·89; H 5·18. Admixture with an authentic sample did not depress this value. Styphnate m.p. 152·6–153·6°, lit.[8]: 151·6 to 152·4°. No melting point depression on admixture with an authentic sample.)


XII


XIII


XIV

According to KLYNE[9] the stereochemistry of ambreinolide is represented by formula XII, from which, however, an unequivocal deduction of a complete stereochemical formula for the tricyclic ketone IX is not possible on the basis of the available evidence. The main uncertainty resides in the assignment of the configuration of the methyl group at C-8. The spatial arrangement of this methyl group in IX may be expected to depend on the mechanism of the transformation V→VI; *a priori* VI could be formed either by a 1, 2-hydride shift or by way of the intermediate formation of the corresponding $\Delta^{8,9}$-unsaturated compound.

The configuration of the hydrogen at C-5 may on the other hand be assumed to have changed from $\alpha$ to $\beta$ in the course of the reaction sequence IV→IX. Conformational considerations indicate that XIV should be thermodynamically more stable than the epimer XIII, regardless of the configuration of the methyl group at C-8. The conditions under which the tricyclic ketone is formed should allow the formation of the more stable epimer, the epimerization at C-5 taking place either at the bicyclic stage or by acid catalyzed isomerisation of XIII to XIV.

*Acknowledgment.* We thank the *National Institutes of Health* for a fellowship to one of us (*W.S.S.*), and the Eli Lilly & Company for generous financial support.

G. BÜCHI, W. S. SAAR, and
A. ESCHENMOSER[10]

*Department of Chemistry Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass., USA, January 29, 1956.*

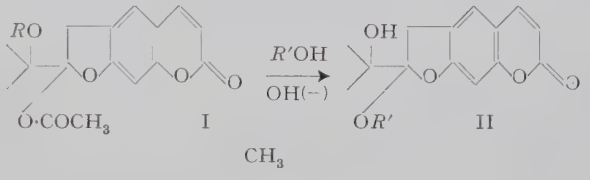
*Zusammenfassung*

Die Struktur eines durch säurekatalytische Isomerisation von Ambreinolid entstehenden tricyclischen Ketons $C_{17}H_{26}O$ wurde aufgeklärt.

[8] G. BÜCHI and J. J. PAPPAS, J. Amer. chem. Soc. *76*, 2963 (1954).
[9] W. KLYNE, J. chem. Soc. 3072 (1953).
[10] Organisch-chemisches Laboratorium der ETH, Zürich.

## Über die Konstitution der Visnagane und Khellactone aus *Ammi visnaga* L.

Vor kürzerer Zeit ist es SMITH, HOSANSKY und BYWATER[1] gelungen, das zuerst von SAMAAN[2] beschriebene, amorphe und koronardilatorisch wirksame Visnagan aus den Samen von *Ammi visnaga* L. in eine Reihe von sehr ähnlichen, kristallisierten Verbindungen aufzutrennen, unter denen sich Visnadin ($C_{21}H_{24}O_7$), Samidin ($C_{21}H_{22}O_7$) und Dihydrosamidin ($C_{21}H_{24}O_7$) finden. Die drei Substanzen stellen Diester eines Glykols dar, in welchem eine Hydroxylgruppe stets mit Essigsäure, die andere mit $\alpha$-Methylbuttersäure, Seneciosäure bzw. Isovaleriansäure verestert ist. Mit alkoholischer Lauge geben die drei Stoffe neben den erwähnten Fettsäuren die gleiche Verbindung, in welcher eine der in den Visnaganen vorkommenden Acyloxygruppen durch eine aus dem zur Verseifung verwendeten Alkohol stammenden Alkoxygruppe ersetzt ist. Letztere Verbindungen sind offensichtlich identisch mit den sogenannten Alkylkhellactonen von unbekannter Struktur, die schon früher von SPÄTH, GRUBER und MATZKE[3] bei der Behandlung des rohen Ätherextraktes von *Ammi visnaga* mit methyl- bzw. äthylalkoholischer Lauge erhalten worden sind. Die amerikanischen Autoren haben den Visnaganen und Alkylkhellactonen die Formeln I bzw. II zugeschrieben.


I II

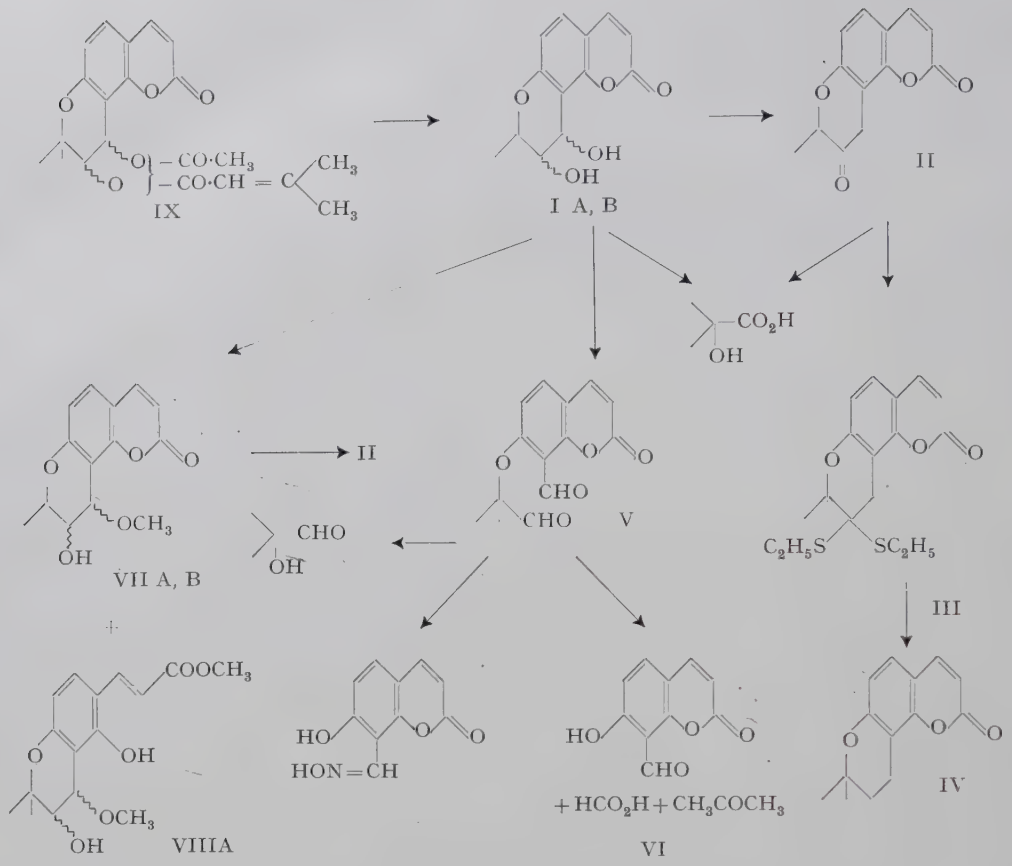
Visnadin $R = -CO{\cdot}CH(CH_3){\cdot}CH_2{\cdot}CH_3$ $R' = CH_3;\ C_2H_5$

Samidin $R = -CO{\cdot}CH = C(CH_3)_2$

Dihydrosamidin $R = -CO{\cdot}CH_2{\cdot}CH(CH_3)_2$

Wir möchten jetzt für diese Substanzen etwas modifizierte Formeln vorschlagen. Aus kristallisiertem Visnagangemisch entstand mit KOH-Dioxan ein Gemisch der beiden am C-Atom 4′ stereoisomeren Khellactone IA (Smp. 186° [– 18°])[4] und IB (Smp. 174–175° [+ 81°]), in welchem IA stark überwiegt. Beide Stoffe gaben kristallisierte Diazetate, mit Chromsäure Azeton, mit Kaliumpermanganat $\alpha$-Oxyisobuttersäure und durch säure-katalysierte Wasserabspaltung das optisch inaktive Keton II (Smp. 156,6–157,5°, $\lambda_{max}$ des 2,4-Dinitrophenylhydrazons etwa 346 m$\mu$; Alkohol). Auch II lieferte bei der Oxydation Azeton bzw. $\alpha$-Oxyisobuttersäure. II wurde über das Diäthylthioketal III in das bekannte Dihydroseselin[5] (IV) umgewandelt. Oxydation von IA mit Perjodsäure bei pH ~ 4 führte zum Dialdehyd V (Smp. 128–130°), dessen Oxydation mit Perjodsäure bei pH ~ 7 den bekannten Umbelliferon-8-aldehyd[6] (VI), Ameisensäure und Azeton gab. Mit Hydroxyl-

[1] Abstr. of Paper 126th Meeting American Chemical Society, New York, Sept. 12–17 (1954), S. 24N. Vgl. auch E. SMITH, L. A. PUCCI und W. G. BYWATER, Science *115*, 520 (1952).
[2] K. SAMAAN, Quart. J. Pharm. Pharmacol. *4*, 14 (1931).
[3] E. SPÄTH, W. GRUBER und O. MATZKE, Canad. J. Chem. *31*, 715 (1953).
[4] Auf ganze Grade abgerundet [$\alpha$]D-Werte in Chloroform.
[5] E. SPÄTH, P. K. BOSE, J. MATZKE und N. C. GUHA, Ber. dtsch. chem. Ges. *72*, 821 (1939).
[6] E. SPÄTH und M. PAILER, Ber. dtsch. chem. Ges. *68*, 940 (1935).




amin entstand aus V das Oxim von VI (Smp. 245–247°), während milde alkalische Spaltung zu α-Oxyisobutyraldehyd führte, der als p-Nitrophenylhydrazon (Smp. 147–148,5°) isoliert wurde.

Mit Natriummethylat entstand aus dem kristallisierten Visnagangemisch eine Mischung von den am C4′ isomeren Methyl-Khellactonen VII A (Smp. 162,5° [– 30°]) und VII B (Smp. 127° [+ 78°]) – in welcher VII A wiederum überwog – neben dem Cumarsäureesterderivat VIII A (Smp. 117–118°). Mit heisser methanolischer Salzsäure bildete sich aus VII B ein Gemenge aus viel VII A und wenig VII B. Dasselbe Substanzgemisch konnte auch aus I A oder I B mit methanolischer Salzsäure gewonnen werden. Säure-katalysierte Methanolabspaltung aus VII A oder VII B führte zum Keton II[7]. Da das reine Samidin (Smp. 138–139° [+ 49°]) ebenfalls I und VII gab, schreiben wir ihm die Formel IX zu. Entsprechende Formeln gelten wahrscheinlich auch für Visnadin und Dihydrosamidin.

Alle aufgeführten Verbindungen zeigten korrekte Analysen. Farbreaktionen, UV- und IR-Spektren sind mit den angegebenen Formeln im Einklang.

Über die genaue Lokalisierung der beiden Fettsäurereste im Samidin, die Stereochemie dieser Substanz, der Khellactone und Alkylkhellactone sowie über weitere Abbaureaktionen werden wir an anderer Stelle berichten.

Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung sprechen wir für die freundlich gewährte Unterstützung unseren besten Dank aus.

W. Bencze, O. Halpern und H. Schmid

*Chemisches Institut der Universität Zürich, den 31. November 1955.*

[7] Diese Reaktion wurde schon von E. Späth, W. Gruber und O. Matzke beschrieben (loc. cit.).

*Summary*

The visnagans from *Ammi visnaga* L. and the stereoisomeric khellactones and methyl-khellactones derived from them were transformed into seselin and umbelliferone-8-aldehyde. These transformations and other degradations lead to revised formulas for these natural compounds.

## $Ar_1$-5 and $Ar_2$-6 Aryl Participation in Ionic and Free Radical Processes[1]

Many cases of ionization of a β-phenylethyl halide or toluenesulfonate I, with the degree of methyl or phenyl substitution sufficiently large[2] on $C_\beta$ and not too large on $C_\alpha$[2], are anchimerically[3] assisted[4], leading to the bridged intermediate[5] II or the rearranged carbonium ion IV. Still other cases of ionization are anchimerically unassisted, leading to the unrearranged carbonium ion III. The latter may rearrange subsequently. With a properly substituted structure, which is not too

[1] Research supported by the Office of Naval Research. – Research sponsored by the Office of Ordnance Research, U. S. Army.

[2] S. Winstein, B. K. Morse, E. Grunwald, K. C. Schreiber, and J. Corse, J. Amer. chem. Soc. *74*, 1113 (1952).

[3] S. Winstein, C. R. Lindegren, H. Marshall, and L. L. Ingraham, J. Amer. chem. Soc. *75*, 147 (1953).

[4] S. Winstein, B. K. Morse, E. Grunwald, K. C. Schreiber, and J. Corse, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 1113 (1952). – e.g. S. Winstein and K. C. Schreiber, J. Amer. chem. Soc. *74*, 2171 (1952).

[5] D. J. Cram, J. Amer. chem. Soc. *71*, 3863 (1949); *74*, 2129 (1952).

favorable[6] for one of the classical open forms of the carbonium ion, III or IV, the bridged form II of the carbonium ion is preferred.

While no definite example of an analogous participation of aryl in a step which generates a free radical is known to us, there are cases of participation of neighboring phenyl in reactions of a preformed free radical center. An example involves the neophyl radical V. This radical rearranges partly to VII before it reacts with a molecule, e.g. Y–S, in the treatment of neophyl chloride with the phenyl Grignard reagent and cobaltous chloride in ether[7], in the peroxide-catalyzed decarbonylation of $\beta$-phenylisovaleraldehyde[8], and in the thermal decomposition of bis-$\beta$-phenylisovaleryl peroxide[9]. As the nature or concentration of Y–S is changed so as to increase its rate of reaction with the neophyl radical, less rearrangement is observed. Thus, in decarbonylation of $\beta$-phenylisovaleraldehyde, the amount of rearrangement increases as the concentration of aldehyde is decreased[10], and it decreases as benzyl mercaptan is added[11].

[6] D. J. Cram and J. D. Knight, J. Amer. chem. Soc. *74*, 5839 (1952). – F. Ahmed and D. J. Cram, J. Amer. chem. Soc. *75*, 339 (1953). – C. J. Collins and W. A. Bonner, J. Amer. chem. Soc. *77*, 92 (1955). – W. A. Bonner and C. J. Collins, J. Amer. chem. Soc. *77*, 99 (1955).

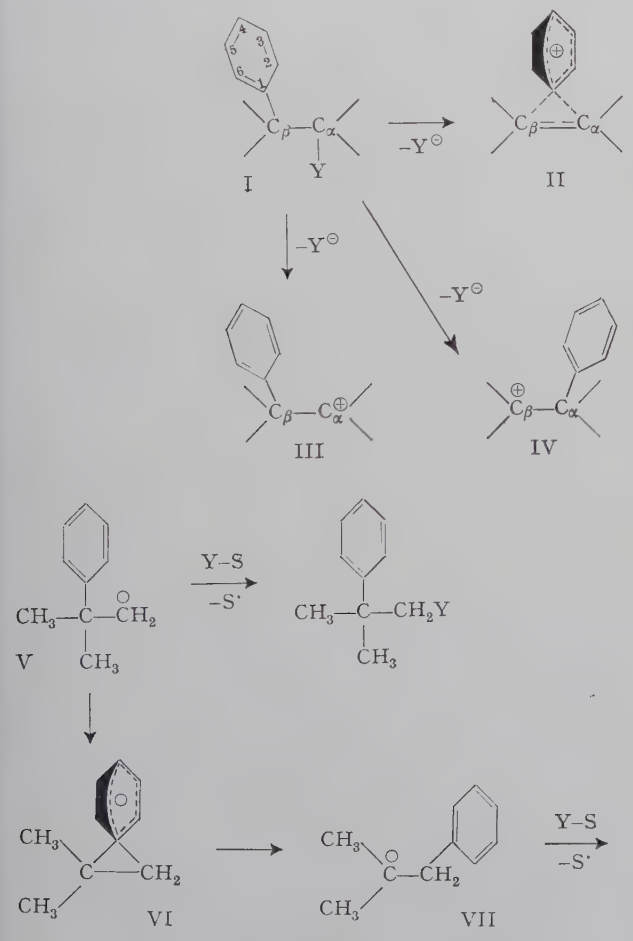
[7] M. S. Kharasch and W. H. Urry, J. Amer. chem. Soc. *66*, 1438 (1944).

[8] S. Winstein and F. Seubold, J. Amer. chem. Soc. *69*, 2916 (1947).

[9] L. Kent, unpublished work.

[10] F. Seubold, J. Amer. chem. Soc. *75*, 2532 (1953).

[11] S. Lapporte, unpublished work.




Further, rearrangement of the neophyl radical is small or completely negligible in other reactions which proceed by way of the neophyl radical, such as the action of bromine on the silver salt of $\beta$-phenylisovaleric acid[12], the chlorination of *t*-butylbenzene[13] and the cleavage of neophylmercuric bromide with hydrogen bromide[11].

We now report some observations on $Ar_1$-5 and $Ar_2$-6 aryl participation[14] in certain ionic and free radical phenomena. With such materials as 4-*p*-anisyl-1-butyl bromobenzenesulfonate (VIII; $R$=H; $X$=*p*-$CH_3O$) or 2,4-dimethoxyphenylbutyl bromobenzenesulfonate [VIII; $R$ = H; $X$ = *o*,*p*-$(CH_3O)_2$], the addition of an anchimerically assisted ionization process ($Ar_1$-5), with a rate constant equal to $k_\Delta$, to the anchimerically unassisted solvolysis process (rate constant $k_s$) is evidenced by an accelerated solvolysis rate compared to 4-phenyl-1-butyl bromobenzenesulfonate (VIII; $R$ = $X$ = H). With the 3,5-dimethoxyphenylbutyl bromobenzenesulfonate [VIII; $R$ = H; $X$ = *m*,*m'*-$(CH_3O)_2$], $Ar_2$-6 participation in solvolysis is similarly evident by enhanced rate.

Both the $Ar_1$-5 and $Ar_2$-6 participations lead to tetralin formation, so that formolysis of arylsulfonates is of preparative value for certain tetralins, as shown in the Table. The rate constant $k_s$ for the methoxylated phenylbutyl bromobenzenesulfonates may be approximated by the rate constant of the unsubstituted phenylbutyl bromobenzenesulfonate; the solvolysis of the latter involves essentially no contribution from an anchimerically assisted ionization process. Thus, the actual solvolysis rate constant may be dissected into the $k_\Delta$ and $k_s$ contributions. The products may be accounted for within the accuracy of isolation of products on the basis that $k_s$ leads to the formate ester of the original alcohol, while $k_\Delta$ leads to tetralin. This procedure is summarized in the Table.

The formation of tetralin from 2,4-dimethoxyphenylbutyl bromobenzenesulfonate [VIII; $R$ = H; $X$ = *o*,*p*-$(CH_3O)_2$] is formulated to involve $Ar_1$-5 participation leading to intermediate $X$. This evidently rearranges with a methylene group shifting to $C_2$ so that the intermediate XI, which would have been formed directly by $Ar_2$-6 participation, is formed. Tetralin XIV is formed by proton loss. Thus, 2,4-dimethoxyphenylbutyl bromobenzenesulfonate, activated for $Ar_1$-5 participation, leads to 5,7-dimethoxytetralin, the same material which is formed from 3,5-dimethoxyphenyl-1-butyl bromobenzenesulfonate, which is activated for $Ar_2$-6 participation. It is interesting that the rate of tetralin formation from 2,4-dimethoxyphenyl-1-butyl bromobenzenesulfonate, which produces tetralin by the indirect route, is actually higher than the rate of formation of tetralin from the 3,5-dimethoxyphenyl-1-butyl bromobenzenesulfonate, which produces tetralin by the more direct route.

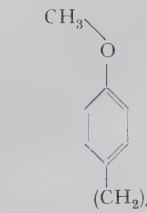
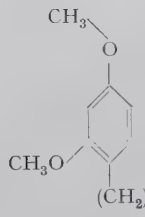
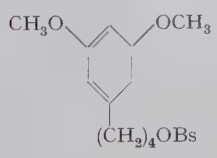
Analogous to the behaviour of 4-*p*-anisyl-1-butyl bromobenzenesulfonate (VIII; $R$ = H; $X$ = *p*-$OCH_3$) is that of 4-*p*-hydroxyphenyl-1-butyl bromide. In this case, the intermediate X ($R$ = H; $X$ = *p*-OH) from anchimeri-

[12] C. Berr, Thesis Univ. California, Los Angeles, 1952.

[13] M. S. Kharasch and H. C. Brown, J. Amer. chem. Soc. *61*, 2142 (1939).

[14] See Chem. and Ind. *1954*, 562. – The participation of a $\beta$-phenyl group is symbolized $Ar_1$-3, Ar denoting aryl. The subscript, 1, refers to the position in the participating aryl group involved in the creation of the ring in the transition state for anchimerically assisted ionization, the size of this ring being indicated by the number following, in this case, 3.

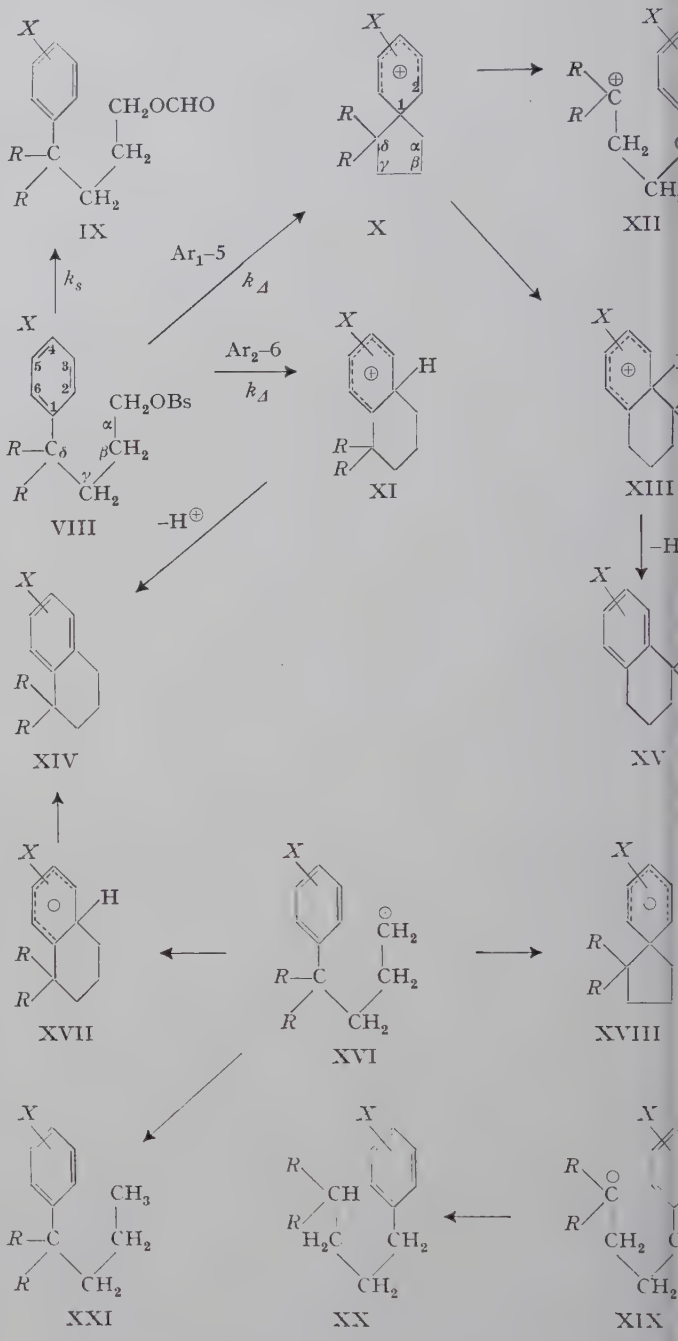
Formation of Tetralins in Formolysis of Bromobenzenesulfonates at 75°C

| Compound | Participation | $k_\Delta/k_s$ | % Tetralin observed | % Tetralin calculated |
|---|---|---|---|---|
|  | $Ar_1$–5 | 0·77 | 54 | 44 |
|  | $Ar_1$–5 | 8·9 | 91 | 93 |
|  | $Ar_2$–6 | 5·1 | 88 | 84 |

cally assisted ionization is the conjugate acid of a dieneone. Typical dieneone-phenol rearrangement[15] of the dieneone yields the tetralol XIV. Heating 4-*p*-hydroxyphenyl-1-butyl bromide alone at 180° gives the tetralol XIV in good yield.

The $Ar_1$-5 route to tetralin may lead to rearrangement since, in the intermediate *X*, either $C_\alpha$ or $C_\delta$ may shift. When $C_\alpha$ and $C_\delta$ are not equivalent, either intermediate XI or XIII may be formed, and, therefore, either tetralin XIV or tetralin XV will be derived. Such a rearrangement has been demonstrated in the formolysis of 4-methyl-4-*p*-anisyl-1-pentyl bromobenzenesulfonate [VIII; $R = CH_3$; $X = p$-$CH_3O$]. The tetralin obtained in 59% yield from this formolysis is essentially entirely 1,1-dimethyl-7-methoxytetralin, in other words, almost entirely the rearranged tetralin XV. Evidently, in the intermediate X, the preference for migration of the tertiary $C_\delta$, rather than primary[16] $C_\alpha$, is quite large, and thus the intermediate XIII and, consequently, the tetralin XV is formed almost completely.

Ring closure with the formation of tetralin has also been observed from 4-aryl-1-butyl free radicals. Thus, substantial amounts of tetralin are observed in the hydrocarbon product from decarbonylation of 5-phenylpentanal and 5-methyl-5-phenylhexanal, the 4-phenyl-1-butyl free radical [XVI; ($R = X = H$)] leading to tetralin XIV ($R = X = H$) and the 4-methyl-4-phenyl-1-pentyl free radical (XVI; $R = CH_3$; $X = H$) leading to tetralin XIV ($R = CH_3$; $X = H$). That $Ar_1$-5 involvement of the phenyl group in the 4-phenyl-1-butyl free radical occurs is clear from the formation of rearranged hydrocarbon XX ($R = CH_3$; $X = H$) along with unrearranged hydrocarbon XXI ($R = CH_3$; $X = H$) from the decarbonylation of 5-methyl-5-phenylhexanal. Evidently, in this case, free radical XVI ($R = CH_3$; $X = H$) leads partly to the spiro radical XVIII ($R = CH_3$; $X = H$), which leads, at least partly, to the rearranged free radical XIX




($R = CH_3$; $X = H$), this in turn leading to rearranged hydrocarbon XX ($R = CH_3$; $X = H$). The relative tendencies for tetralin formation by initial $Ar_1$-5 involvement or by $Ar_2$-6 involvement of phenyl in a free radical are not yet clear. However, with the 4-methyl-4-*p*-chlorophenyl-1-pentyl free radical XVI ($R = CH_3$; $X = p$-Cl), tetralin formation appears to occur largely by $Ar_2$-6 involvement. Although there are difficulties which attend the infrared spectral analysis of the products, it is clear that the tetralin is at least mainly the unrearranged one, XIV.

The contrast in the behavior of the spiro carbonium ion and free radical X and XVIII, respectively, is in-

[15] A. L. Wilds and C. Djerassi, J. Amer. chem. Soc. *68*, 1715 (1946). – R. T. Arnold, J. S. Buckley, Jr., and R. M. Dodson, J. Amer. chem. Soc. *72*, 3153 (1950).

[16] See R. B. Woodward and T. Singh, J. Amer. chem. Soc. *72*, 494 (1950).

teresting. The spiro carbonium ion X ($R = CH_3$; $X = p$-$CH_3O$) from 4-methyl-4-*p*-anisyl-1-pentyl bromobenzenesulfonate leads essentially exclusively to tetralin XV, but it does not lead appreciably to rearranged carbonium ion XII, in which $C_\delta$ has become disengaged from the benzene ring. On the other hand, the spiro free radical XVIII does lead to rearranged free radical XIX, in which the tertiary carbon atom has become disengaged from the benzene ring.

Recently postulated free radical rearrangements which seem analogous to the one leading from XVI to XIX are those involved in the transformation of $\beta,\beta,\beta$-triphenylpropionic acid into phenyl $\beta,\beta$-diphenyl-$\beta$-methoxypropionate by electrolysis in methanol[17] and the formation of phenyl salicylate in the thermal decomposition of 2-phenoxybenzoyl peroxide[18].

S. Winstein, R. Heck,
S. Lapporte[19], and R. Baird[20]

*Department of Chemistry, University of California, Los Angeles 24, California, October 21, 1955.*

*Zusammenfassung*

Die Beteiligung von Arylgruppen in Solvolysen von 4-Aryl-1-butylhalogeniden und Arylsulfonaten sowie in Reaktionen von freien 4-Aryl-1-butyl-radikalen wird diskutiert. Bei geeignet methoxylierten oder hydroxylierten 4-Aryl-1-butylverbindungen kann die Formolyse entweder mit $Ar_1$-5- oder $Ar_1$-6-Arylbeteiligung verlaufen. Dies führt zur Bildung von Tetralin. Da bei $Ar_1$-5-Beteiligung ein Spirocarboniumion entsteht, in welchem entweder $C_\alpha$ oder $C_\delta$ der ursprünglichen Butylseitenkette wandern kann, ist es möglich, dass ein anderes Tetralin geformt wird als auf dem direkteren $Ar_2$-6-Weg. Als Beispiel dient die Formolysenreaktion von 4-*p*-Anisyl-4-methyl-1-pentylbrombenzolsulfonat.

[17] E. C. Kooyman and H. Breederveld, private communication.
[18] D. F. DeTar and A. Hlynsky, J. Amer. chem. Soc. *77*, 4411 (1955).
[19] Dow Chemical Company Predoctoral Fellow, 1954–55.
[20] National Science Foundation Predoctoral Fellow, 1953–55.

## Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Bianconekalken des Südtessins*

1. *Einleitung.* Im Rahmen einer grösseren Arbeit über ausgewählte Probleme der Schichtung untersuchte einer der Verfasser (Grunau) den Bankungsrhythmus in den Bianconekalken des Südtessins. Zu diesen Studien wurden das Bianconekalkprofil (Bellavista 1) am Autosträsschen Bellavista-Mendrisio im obersten Abschnitt bei Bellavista (halbe Höhe Monte Generoso), und Teile des altbekannten Breggia-Bianconeprofiles (Breggia 3) bei Balerna-Chiasso (Vonderschmitt[1]) detailliert aufgenommen. Um die stratigraphische Stellung des Bianconekalkes zu präzisieren, erwies es sich als unumgänglich, den Mikrofossilinhalt (in erster Linie die Tintinniden und Nannoconus) zu charakterisieren. An über 80 Dünnschliffen konnte ein Einblick in die faunistischen Verhältnisse gewonnen werden. Wegen der ausserordentlichen Kleinheit (10 bis etwa 30 $\mu$) der die Grundmasse des Bianconekalkes bildenden zapfenförmigen Organismen (Nannoconi) unabgeklärter systematischer Stellung (Brönnimann[2]) schien es jedoch angebracht, die lichtmikroskopischen Untersuchungen durch die Anwendung des Elektronenmikroskops zu ergänzen. Die präparativen Arbeiten nach dem Abdruckverfahren und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen hat einer von uns (Studer) im Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Berner Chemischen Institutes durchgeführt.

Unseres Wissens ist das Elektronenmikroskop in der Geologie-Paläontologie bis heute wenig verwendet worden. Im Jahre 1952 erschienen zwei Publikationen (Kamptner[3] sowie Braarud und Nordli[4]), in denen elektronenmikroskopische Aufnahmen von aus dem Gesteinsverband isolierten Coccolithen abgebildet sind. Im folgenden Jahr kam eine Arbeit von Deflandre und Fert[5] heraus, die sich wiederum mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen an isolierten Coccolithen befasst.

2. *Experimentelles.* Die Kalkproben wurden in kleine Platten von einigen Millimetern Dicke zerschnitten und auf einer Seite angeschliffen und poliert. Die polierten Proben wurden 30 s in 2*n*-Salzsäure geätzt, anschliessend gewaschen und im Wärmeschrank getrocknet.

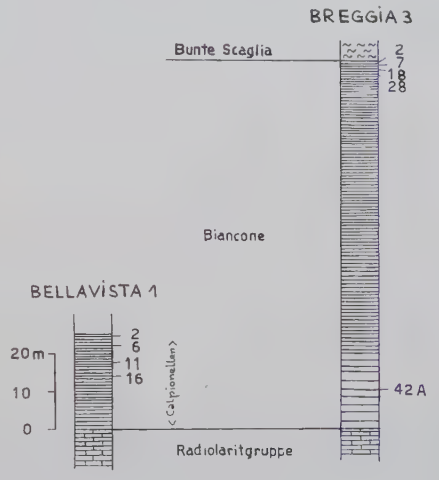



Abb. 1. Schematische Kolonnenprofile des Bianconekalkes von Bellavista *1* (auf halber Höhe des Monte Generoso) und Breggia *3* (Breggiaschlucht bei Balerna-Chiasso, im südlichsten Zipfel des Tessins). Die Nummern beziehen sich auf den Text und Abbildungen 2–5.

Für die elektronenmikroskopische Präparation stellten wir Oberflächenabdrucke nach dem Polystyrol-Siliciummonoxyd-Verfahren her (Heidenreich und Peck[6]; Stäger und Studer[7]). Vorgepresste Plättchen aus Polystyrol von ungefähr 0,3 mm Dicke und 10 × 10 mm Fläche wurden unter einer Belastung von 500 g während einer Stunde bei 115–120° C gegen die Oberfläche des geätzten Schliffes gepresst. Die Abdrucke wurden in einem Vakuumtrockenschrank ausgeführt, da beim Arbeiten unter Atmosphärendruck die in den ausge-

* Die Arbeit wurde unterstützt durch den Schweizerischen Nationalfonds.

[1] L. Vonderschmitt, Eclogae geol. Helv. *33*, Nr. 2 (1940).
[2] P. Brönnimann, Micropaleontology *1*, Nr. 1 (1955).
[3] E. Kamptner, Mikroskopie, Wien, *7*, H. 7–8 und H. 11–12 (1952).
[4] T. Braarud und E. Nordli, Nature *1952*, Nr. 4322, 361.
[5] G. Deflandre et Ch. Fert, Bull. Soc. Hist. nat. Toulouse *88*, (1953).
[6] R. D. Heidenreich und V. G. Peck, J. appl. Phys. *14*, (1943).
[7] H. Stäger und H. Studer, Technische Mitteilungen *1956* (im Druck).

ätzten Vertiefungen und Poren des Kalkes vorhandene Luft durch die Wärmeausdehnung an der Grenzfläche zwischen Kalk und Polystyrol Bläschen bildet.

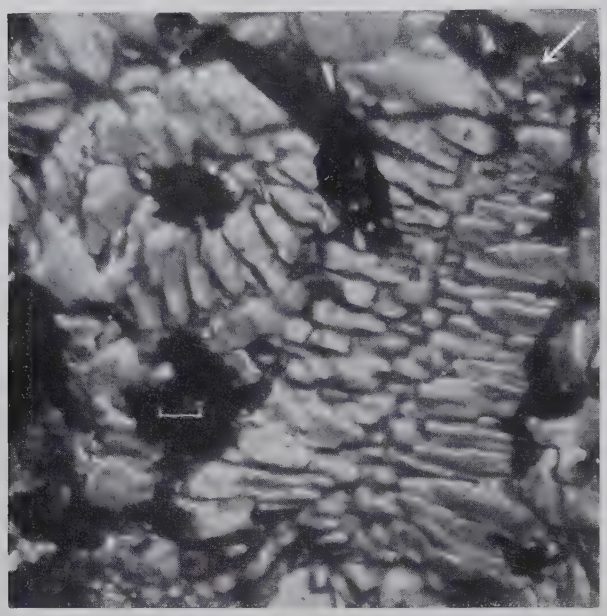


Abb. 2. Elektronenmikroskop-Aufnahme von *Nannoconus steinmanni* (Längsschnitt) und *Nannoconus sp.* (Querschnitt). Bellavista 1/6. 5000fach. Horizontaler Strich = 1$\mu$. Pfeil gibt Beschattungsrichtung an.

Die auf Zimmertemperatur abgekühlten Abdrucke wurden zuerst in Salzsäure vom anhaftenden Kalk befreit und anschliessend in Flußsäure gewaschen, um die an der Polystyroloberfläche klebenden Toneinschlüsse des Kalkes zu entfernen. Auf die gereinigten Polystyrolabdrucke wurde in üblicher Weise eine SiO-Schicht von ungefähr 200 Å Dicke aufgedampft (etwa 1 mg SiO im Abstand von 120 mm), das Polystyrol im Kondensationsapparat weggelöst und die isolierten SiO-Filme schräg mit Schwermetall bedampft (Gold/Manganin, Winkel 1:2).

Die für die richtige Beurteilung des Oberflächenreliefs anzunehmende Beleuchtungsrichtung ist auf jedem Bild als Pfeil eingezeichnet.

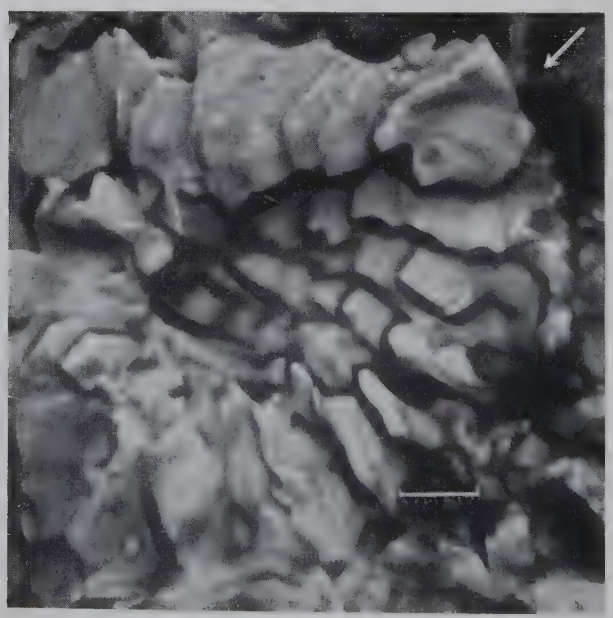


Abb. 3. Elektronenmikroskop-Aufnahme von *Nannoconus sp.*, schief geschnitten. Die Beschattung des Abdruckes mit Gold erzeugt eine starke Plastizität, die die spiralige Anordnung der Kalzitlamellen deutlich erkennen lässt. Bellavista 1/6. 10000fach.

Abb. 4. Elektronenmikroskop-Aufnahme von *Nannoconus globulus*. Breggia 3/18. 6000fach.

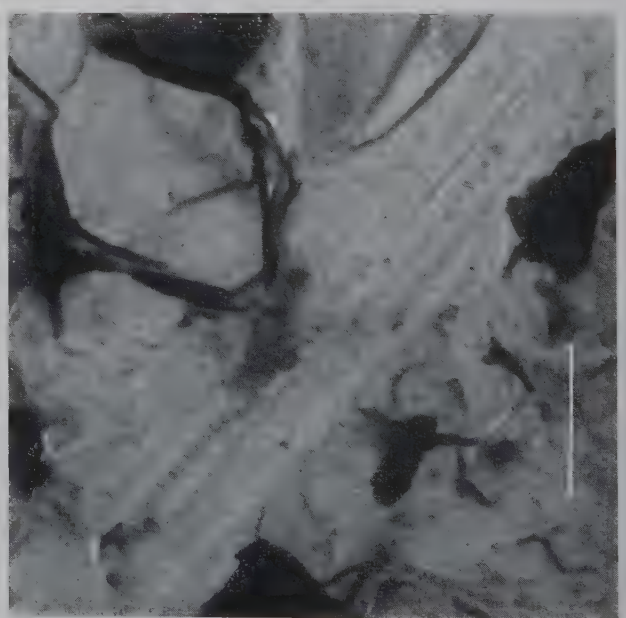


Abb. 5. Elektronenmikroskop-Aufnahme der anorganischen Grundmasse. Erkennbar sind ein Karbonatrhromboeder und ein Karbonatstengel. Bellavista 1/16. 20000fach. Nicht beschattet.

3. *Ergebnisse.* a) *Anwendbarkeit des Elektronenmikroskops zur Untersuchung von Bianconekalken.* Die im Elektronenmikroskop erzielten Aufnahmen von Bianconekalken und den sie aufbauenden kleinsten Organismen (Nannoconi) sind lichtmikroskopischen Bildern klar überlegen. Einzelheiten lassen sich bei elektronenmikroskopischen Vergrösserungen von 4000mal deutlich erkennen. Vergrösserungen bis zu 15000mal ergeben keine neuen Gesichtspunkte. Durch die Beschattung mit Gold erreicht man eine Plastizität, die diagnostisch von grosser Bedeutung ist (Abb. 3).

Den Vorteilen der elektronenmikroskopischen Untersuchung stehen auch eine Reihe von Nachteilen gegenüber. Zunächst ist zu bedenken, dass der im Elektronenmikroskop zu betrachtende Abdruck einen Durchmesser von bloss 2 mm hat, wobei das runde Drahtgitterchen, worauf der Abdruck angebracht ist, noch einen guten Teil verdeckt. Demgegenüber weist der für das Lichtmikroskop verwendete Dünnschliff eine Beobachtungsfläche von etwa 6 bis 8 $cm^2$ auf.

Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass der Kalk vor dem Abdruck mit Salzsäure schwach angeätzt werden muss. Dadurch entsteht ein oft skelettartiges Ätzbild, das sich vom nicht angeätzten Dünnschliffbild etwas unterscheidet.

Die Präparation der Kalke für die elektronenmikroskopische Untersuchung ist relativ zeitraubend, ebenso die Betrachtung im Elektronenmikroskop selbst. Demgegenüber ist das Lichtmikroskop ohne langwierige Vorbereitung stets zur Hand.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass elektronenmikroskopische Untersuchungen zur genauen Beschreibung kleinster Organismen, wie sie im Bianconekalk auftreten, in Zukunft wohl unerlässlich sind. Zudem kann auch der nichtorganische, feinste Anteil der Kalkgrundmasse morphologisch einwandfrei charakterisiert werden (Abbild. 5). Allerdings vermögen elektronenmikroskopische Untersuchungen die Betrachtung von Dünnschliffen im Lichtmikroskop niemals zu verdrängen. Das Elektronenmikroskop stellt sich dem Lichtmikroskop als willkommener Helfer, aber nicht als gleichberechtigter Partner zur Seite.

b) *Die stratigraphische Bedeutung von Nannoconus.* Die Frage nach der stratigraphischen Bedeutung von Nannoconus ruft nach Beantwortung der allgemeineren Frage der stratigraphischen Stellung des Bianconekalkes. Zunächst sei auf die vorzüglichen neueren Arbeiten von Vonderschmitt[1] und Kuhn und Vonderschmitt[8] verwiesen, die eine Übersicht über unsere heutigen Kenntnisse der Südtessiner Geologie und die noch zu lösenden Probleme geben. Mit mikropaläontologischen Fragen des Bianconekalkes haben sich in allerletzter Zeit Renz[9] und Brönnimann[2] befasst. Nach Vonderschmitt[1] umfasst der Bianconekalk der Breggiaschlucht die Stufen Tithon bis und mit Barrémien.

Unsere Untersuchungen über die Tintinnidenfauna der untersten 22 m Bianconekalk von Bellavista 1 haben zu folgenden Ergebnissen geführt (Einzelheiten werden nächsthin veröffentlicht):

Häufig: *Calpionella alpina* Lorenz, *Calpionella elliptica* Cadisch, *Tintinnopsella carpathica* (Murgeanu und Filipescu).

Selten: *Tintinnopsella cadischiana* Colom, *Tintinnopsella oblonga* (Cadisch), *Favelloides pseudoserrata* Colom (1 Stück).

Es handelt sich hier um eine Grenzfauna Obertithon-Berriasien. Dabei treten jedoch die oben angeführten seltenen Formen stratigraphisch etwas tiefer auf als dies Colom[10] auf seiner Verbreitungstabelle angibt.

Während die untere Altersgrenze des Biancone mit Obertithon-Berriasien einwandfrei fixiert werden kann, lässt sich die obere Altersgrenze nicht durch Leitfossilien belegen. Brönnimann[2] spricht zwar auf Seite 33 unten von «well-established Barremian age» des oberen Teiles des Biancone, was im Breggiaprofil nicht direkt bewiesen ist.

Nach Brönnimann[2], der sich mit der stratigraphischen Stellung von Nannoconus eingehend befasst, tritt im unteren Teil des Biancone, mit Calpionellen vergesellschaftet, *Nannoconus steinmanni* auf, während im obersten Teil *N. steinmanni* (häufig), *N. globulus* (häufig), *N. colomi* (selten) und *N. bermudezi* (selten) vorkommen.

Unsere Untersuchung (Lichtmikroskop und Elektronenmikroskop) der Nannoconus Vergesellschaftung ergab folgendes: Im unteren Teil des Biancone von Bellavista 1 und Breggia 3 (Abb. 1) treten, mit den oben erwähnten Tintinniden vergesellschaftet, folgende Formen auf:

*N. steinmanni* Kamptner (häufig), kleine Form von *N. globulus* Brönnimann (nicht selten), *N. bermudezi* Brönnimann (selten, 1/11 und 3/42 A auf Abb. 1).

Direkt über den calpionellenführenden Schichten von Bellavista 1 tritt *N. kamptneri* Brönnimann auf (1/2 auf Abb. 1).

Im obersten Teil des Biancone von Breggia 3 sind zu finden: *N. steinmanni* Kamptner (häufig), *N. globulus* Brönnimann (häufig), *N. bermudezi* Brönnimann (selten), *N. kamptneri* Brönnimann (selten), *N. colomi* (de Lapparent) (selten). Keine Tintinniden.

Für die beiden angeführten Bianconeprofile lassen sich folgende vorläufige Schlussfolgerungen ziehen:

*N. steinmanni* und *N. bermudezi* besitzen keinen Leitwert. *N. globulus* tritt in den unteren Teilen der beiden Profile selten auf, ist jedoch im oberen Teil häufig anzutreffen. *N. kamptneri* kommt unmittelbar über den calpionellenführenden Bänken von Bellavista 1 und im oberen Teil von Breggia 3 vor, während *N. colomi* auf die oberen Teile von Breggia 3 beschränkt zu sein scheint.

H. R. Grunau und H. Studer

*Geologisches Institut und Laboratorium für Elektronenmikroskopie des anorganisch-chemischen Instituts der Universität Bern, den 29. Januar 1956.*

*Summary*

The Biancone limestone (Uppermost Jurassic-? Barremian) from southern Ticino, and the small organisms (Nannoconi incertae sedis) of which it mainly consists, have been examined in the electron microscope.

The applied technique of preparing the limestone for investigation is described.

Furthermore, a few remarks are made concerning the stratigraphic value of Nannoconus.

[8] E. Kuhn und L. Vonderschmitt, Eclogae geol. Helv. *46*, Nr. 2 (1953).

[9] C. Renz, Eclogae geol. Helv. *40*, Nr. 2 (1947); *41*, Nr. 2 (1948).

[10] G. Colom, J. Pal. *22*, Nr. 2 (1948).

## Inhibition by Food Restriction of the Renal Damage Due to Corticoid-Overdosage

The syndrome of nephrosclerosis with hypertensive cardiovascular disease, produced by mineralocorticoid-overdosage in the rat, is frequently used to test drugs (sodium-exchange resins, antihistaminics, chlorpromazine, rauwolfia), suspected of having a beneficial effect upon comparable disease-manifestations in man (for lit. see[1]). It must be kept in mind, however, that treatment with some of these drugs seriously interferes with the appetite of experimental animals. We have often noticed that in rats which refuse their food (e.g., because of some incidental disease), it is particularly difficult to produce renal and cardiovascular lesions with desoxycorticosterone; hence it seemed of interest to establish the effect of partial food restriction upon the evolution of this experimental syndrome.

Treatment with glucocorticoids tends to antagonize many of the pathologic lesions normally elicited by overdosage with mineralocorticoids[2], but in this respect the kidney represents a notable exception[1]. In rats in which nephrosclerosis is produced by desoxycorticosterone, the renal damage is further aggravated by cortisone or cortisol, even if the animals lose body-weight as a result of glucocorticoid-treatment[1].

In view of these facts, we decided to undertake experiments on rats overdosed either with desoxycorticosterone alone or with desoxycorticosterone plus cortisol, and to determine the effect of food restriction upon the resulting syndromes.

*Experimental Materials and Techniques.* Fifty female Sprague-Dawley rats, having an initial body-weight of 94–104 g, were sensitized to the production of nephrosclerosis by removal of their right kidney and subsequent administration of 1% NaCl as a drinking fluid. At the same time, the animals were subdivided into five groups, each consisting of ten rats with an average body-weight of 99 g.

Beginning on the day of the operation, all the animals, except the controls (Group I), were given daily subcutaneous injections of 1 mg of desoxycorticosterone acetate (DOCA) in the form of microcrystals, suspended in 0·2 ml of water containing a trace of "Tween 80". Groups II and IV received no other hormone-treatment while Groups III and V were given simultaneous injections of 1 mg of cortisol acetate (COLA) in the same form. Groups I, II and III had unrestricted access to food ("Purina Fox Chow"), while in Groups IV and V food-intake was so restricted that the animals lost about $^1/_5$ to $^1/_4$ of their initial body-weight in the course of the experiment. The NaCl-solution was available to all animals without restriction throughout the experiment, and their voluntary fluid-intake was measured daily.

After 20 days of treatment all the animals were killed, their organs fixed in Susa-mixture, weighed and histologically examined.

*Results.* It will be seen from the Table that in the controls (Group I) and in the animals receiving DOCA alone (Group II) there was a considerable gain in body-weight during the 20 days of observation. In the latter group the kidney was much enlarged and there was also marked nephrosclerosis with an increase in fluid-intake and some myocarditis. Simultaneous treatment with COLA (Group III) resulted in a moderate loss of body-weight and a slight diminution of the renal hypertrophy, as judged by the absolute weight of the kidney, but the relative renal weight was not diminished and the nephrosclerosis was actually aggravated as a result of the additional glucocorticoid-treatment. The fluid-intake and the myocarditis were not markedly altered in Group III, as compared with Group II.

On the other hand, the animals in Group IV, which lost 20% of their body-weight as a result of the partial starvation, showed no trace of renal or cardiac lesions, no marked renal hypertrophy and no increase in fluid-intake.

Although the animals in Group V lost even more body-weight than those in Group IV, they did exhibit not only a percentual but even an absolute increase in renal weight and cardiac weight. At the same time, there was marked nephrosclerosis and some myocarditis, as well as a moderate increase in fluid-intake.

*Discussion.* From these experiments it is obvious that, in rats receiving an unrestricted food-intake, the renal damage produced by DOCA is further aggravated by COLA. Partial starvation completely inhibited the nephrosclerosis and myocarditis caused by DOCA-overdosage under our experimental conditions. On the other hand, in rats simultaneously overdosed with DOCA and COLA, restriction of food-intake exerted a much less pronounced inhibitory effect upon the resulting renal damage and virtually none upon the myocarditis.

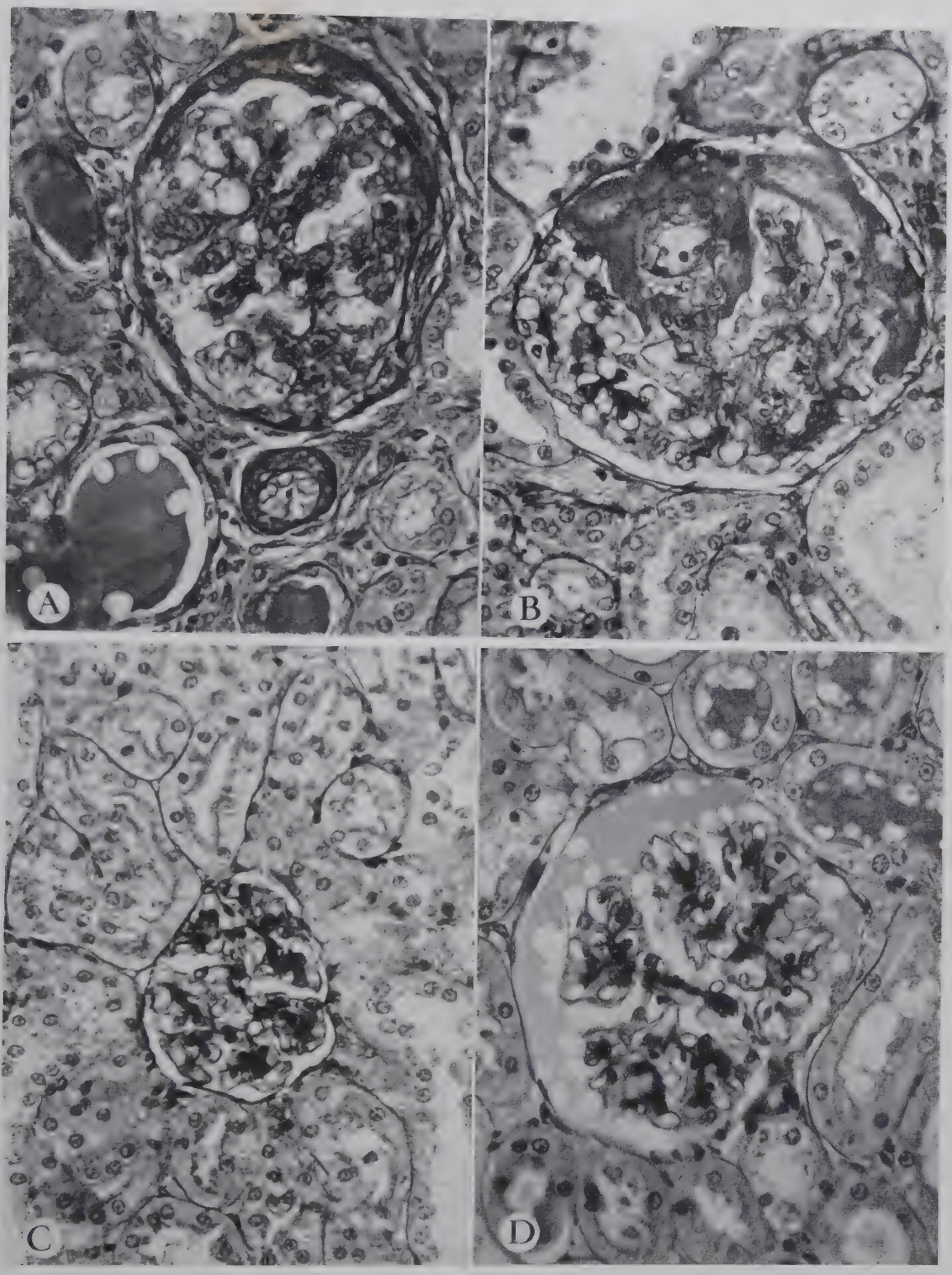
[1] H. Selye, *Stress. The Physiology and Pathology of Exposure to Systemic Stress* (Acta Inc. Med. Publ., Montreal, 1950); *First Annual Report on Stress* (Acta Inc. Med. Publ., Montreal, 1951). – H. Selye and A. Horava, *Second* (1952) and *Third* (1953) *Annual Reports on Stress* (Acta Inc. Med. Publ., Montreal). – H. Selye and G. Heuser, *Fourth Annual Report on Stress* (Acta Inc. Med. Publ., Montreal, 1954); *Fifth Annual Report on Stress* (M D Publ. Inc., New York, 1955).

[2] H. Selye, Exper. *11*, 35 (1955).

Inhibition by food restriction of the renal damage due to corticoid-overdosage

| Group | DOCA (mg) | COLA (mg) | Food-Intake | Final Body-weight (g) | Weight Gain (%) | Kidney | | | Heart | | | Fluid-Intake (ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Weight (mg) | (%)* | Nephro-Sclero-sis | Weight (mg) | (%)* | Myo-carditis | |
| I | 0 | 0 | Unrestricted | 166 | +66 | 1186 ± 32·0 | 717 | 0 | 636 ± 15·9 | 384 | 0 | 54 ± 4·3 |
| II | 1 | 0 | Unrestricted | 131 | +32 | 1706 ± 60·5 | 1300 | ++ | 622 ± 5·8 | 474 | + | 112 ± 4·5 |
| III | 1 | 1 | Unrestricted | 90 | − 9 | 1310 ± 72·0 | 1475 | +++ | 472 ± 14·8 | 537 | + | 130 ± 8·4 |
| IV | 1 | 0 | Restricted | 79 | −20 | 699 ± 22·7 | 878 | 0 | 360 ± 7·5 | 454 | 0 | 42 ± 3·3 |
| V | 1 | 1 | Restricted | 72 | −27 | 955 ± 37·5 | 1376 | ++ | 392 ± 7·3 | 543 | + | 87 ± 5·2 |

* Organ-weight in mg/100 g body-weight.




Effect of food restriction upon renal damage due to corticoid-overdosage.–*A* Kidney of rat receiving DOCA on an unrestricted diet (Group II). The glomerulus is greatly enlarged and partly hyalinized. The tubules are dilated and several of them contain hyalin-casts. *B* Kidney of rat receiving both DOCA and COLA on an unrestricted diet (Group III). Changes essentially similar to those in previous picture. *C* Treatment same as in "*A*" but the animal is kept on a restricted diet (Group IV). Renal structure essentially normal. *D* Treatment same as in "*B*" but the rat is kept on a restricted diet (Group V). Hyalinization is diminished, but there is still considerable accumulation of proteinaceous material in Bowman's capsule and there are hyalin-casts in the tubules.

We may conclude that – quite apart from their specific actions – drugs and other experimental conditions, which damage animals and thereby diminish their voluntary food-intake, may also inhibit the production of nephrosclerosis by corticoids through the partial starvation thus induced. As judged by the experiments

reported here, such a nonspecific antinephrosclerotic effect is less likely to occur, however, in animals receiving conjoint treatment with DOCA and COLA[3].

The authors wish to thank the Schering Corporation for supplying desoxycorticosterone acetate ("Cortate"), the Pfizer Laboratories for cortisol acetate ("Cortril"), and Mr. K. Nielsen for the preparation of the photomicrographs.

P. Bois and H. Selye

*Institut de Médecine et de Chirurgie expérimentales, Université de Montréal, Canada, November 14, 1955.*

*Zusammenfassung*

Bei Ratten, die durch einseitige Nierenexstirpation und 1% NaCl als Trinkflüssigkeit sensibilisiert wurden, war die Nephrosklerose, die normalerweise durch das Desoxycorticosteronacetat (DOCA) hervorgerufen wird, durch gleichzeitige Zufuhr von Cortisolacetat (COLA) noch verstärkt. Einschränkung der Nahrungszufuhr kann die Produktion von Nephrosklerose durch DOCA vollkommen verhindern, Unterernährung hat jedoch viel weniger Einfluss auf das Entstehen derartiger Nierenveränderungen nach gleichzeitiger Behandlung mit DOCA und COLA.

[3] This work was supported by a Grant from the Gustavus and Louise Pfeiffer Research Foundation.

## Über Pflanzenwachstumsregulatoren*

*Über weitere phytotoxische Triazine*

In einer ersten Mitteilung[1] haben wir über die phytotoxischen Eigenschaften des 2-Chlor-4, 6-bis-(diäthylamino)-s-triazins (G 25804) berichtet. Bei der Weiterbearbeitung dieser Körperklasse fanden wir nun einige Verbindungen[2], die eine wesentlich stärkere Aktivität aufweisen:

| | X | Y | F | umkristallisiert aus: |
|---|---|---|---|---|
| G 27692 | $-NHC_2H_5$ | $-NHC_2H_5$ | 224–225° | Dimethylformamid[3] |
| G 27901 | $-N(C_2H_5)_2$ | $-NHC_2H_5$ | 101–103° | Äthanol[4] |
| G 28279 | $-NH_2$ | $-NHC_2H_5$ | 177–178° | Dioxan[5] |
| G 28509 | $-NHCH_3$ | $-NHC_2H_5$ | 236–237° | Dimethylformamid[6] |
| G 28510 | $-NHCH_3$ | $-NHC_3H_7$ | 203–205° | Äthylcellosolve |

Die 2-Chlor-4, 6-diamino-s-triazine lassen sich aus Cyanurchlorid durch Umsatz mit den entsprechenden aliphatischen Aminen leicht in guter Ausbeute erhalten. Sie sind als Chemikalien mit Ausnahme von G 28510 bereits beschrieben. Lediglich G 28279 hat eine Wasserlöslichkeit, die bei 20° C 1 ‰ übersteigt. Abgesehen von G 27901 sind sie in den üblichen organischen Lösungsmitteln bei Zimmertemperatur schwer löslich. Das Chloratom kann durch mässig konzentrierte Mineralsäure bei Wasserbadtemperatur hydrolysiert werden.

Fungizide und insektizide Eigenschaften wurden bei den genannten Verbindungen nicht oder in höchst geringem Masse angetroffen. Die Toxizitäten[7] gegenüber Warmblütern sind als gering zu bezeichnen, wie aus der folgenden Tabelle hervorgeht:

| | DL 50 Maus per os | | DL 50 Ratte per os | |
|---|---|---|---|---|
| G 27692 | > 5 | g/kg | > 5 | g/kg |
| G 27901 | 1,75 | ,, | 3,75 | ,, |
| G 28279 | 0,48 | ,, | 0,48 | ,, |
| G 28509 | 2,5 | ,, | > 5 | ,, |
| G 28510 | 1 | ,, | 2,2 | ,, |

Zur ersten biologischen Beurteilung wurden dieselben Testmethoden benützt, wie wir sie in unserer ersten Mitteilung[1] beschrieben haben.

Es zeigte sich, dass auch diese Substanzen selbst *keinen Wuchsstoffcharakter* im klassischen Sinne aufweisen und den natürlichen Wuchsstoffhaushalt nicht stören. Waagrecht gelegte Bohnen, deren Epikotylunterseiten mit den Substanzen behandelt worden waren, entwickelten völlig normale negativ geotropische Reaktionen.

Dass auch die *Samenkeimung* praktisch nicht beeinflusst wird, geht aus Tabelle I hervor:

*Tabelle I.* Indexziffer: 10 = normale Keimung, 0 = keine Keimung, 9–1 = Zwischenstufen, über 10 = erhöhte Keimung.

| Produkt | Testpflanzen | | |
|---|---|---|---|
| | Hafer (*Avena sativa* L.) | Senf (*Sinapis alba* L.) | Gurken (*Cucumis sativus* L.) |
| G 27692 | 10 | 9 | 11 |
| G 27901 | 10 | 8 | 12 |
| G 28279 | 10 | 10 | 10 |
| G 28509 | 10 | 10 | 11 |
| G 28510 | 10 | 10 | 10 |
| G 25804 | 10 | 10 | 12 |
| 2,4-D | 10 | 1 | 5 |
| CMU* | 10 | 10 | 11 |
| unbehandelt | 10 | 10 | 10 |

* = 4-Chlorphenyl-dimethyl-harnstoff (Du Pont).

Die *Wirkung auf das Wachstum* der Keimpflanzen ist aus Tabelle II ersichtlich.

Die Beobachtungen liessen erkennen, dass die fünf Verbindungen eine ähnliche Wirkungsweise wie G 25804 aufweisen. Gramineen werden zuerst chlorotisch und sterben hernach ab. An Keimpflanzen von Senf werden als erste Vergiftungssymptome Dürreerscheinungen an den Rändern der Kotyledonen sichtbar; schliesslich vertrocknet die Pflanze, ohne dass eine Farbveränderung sichtbar wird. Das Absterben tritt in der Regel innerhalb drei Wochen ein. Im Vergleich zu CMU wirken die genannten Triazine etwas langsamer.

* 2. Mitteilung.

[1] A. Gast, E. Knüsli und H. Gysin, Exper. *11*, 107 (1955).

[2] Verwendung zum Patent angemeldet.

[3] A. W. Hofmann, Ber. deutsch. chem. Ges. *18*, 2755 (1885). – W. M. Pearlman und C. K. Banks, Amer. Soc. *70*, 3728 (1948). – J. T. Thurston *et al.*, Amer. Soc. *73*, 2981 (1951).

[4] W. M. Pearlman und C. K. Banks, Amer. Soc. *70*, 3728 (1948).

[5] O. Diels, Ber. deutsch. chem. Ges. *32*, 700 (1899). – W. M. Pearlman und C. K. Banks, Amer. Soc. *70*, 3728 (1948).

[6] O. Diels, Ber. deutsch. chem. Ges. *32*, 700 (1899).

[7] Wir verdanken die Bestimmungen Herrn Prof. Dr. Domenjoz.

*Tabelle II.* Indexziffer: 10 = normales Wachstum, 0 = kein Wachstum, 9–1 = Zwischenstufen.

| Produkt | Testpflanzen | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hafer (*Avena sativa* L.) | | Senf (*Sinapis alba* L.) | | Gurken (*Cucumis sativus* L.) | |
| | Beobachtungen nach Tagen | | | | | |
| | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 |
| G 27692 | $10^a$ | $0^b$ | 3 | $0^b$ | 7 | $0^b$ |
| G 27901 | 10 | $0^b$ | 3 | $0^b$ | 4 | $0^b$ |
| G 28279 | 8 | $0^b$ | 4 | $0^b$ | 5 | $0^b$ |
| G 28509 | 10 | $0^b$ | 9 | $0^b$ | 10 | $0^b$ |
| G 28510 | 10 | $0^b$ | 9 | $0^b$ | 10 | $0^b$ |
| G 25804 | $10^a$ | $6^a$ | $3^a$ | $0^b$ | $7^a$ | $1^a$ |
| 2,4-D | 5 | 7 | 0 | $1^c$ | 0 | $1^c$ |
| CMU | $10^a$ | $0^b$ | $3^a$ | $0^b$ | $4^a$ | $0^b$ |
| unbehandelt | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |

$a$ = chlorotisch $b$ = abgestorben $c$ = verzögerte Keimung

In ersten Feldversuchen wurden vorläufig die Substanzen G 27692, G 27901 und G 28279 geprüft. Dabei erwies sich G 27692 als interessanteste Verbindung. Ihre Überlegenheit lässt nachstehendes Beispiel deutlich erkennen.

4,5 m² grosse Parzellen wurden am 28. April 1955 mit den erwähnten Herbiziden in Dosierungen von 1, 2½ und 5 kg A.S./ha behandelt. Am 9. August wurden alle vorhandenen Unkräuter geerntet und gewogen (Tabelle III).

*Tabelle III.* Unkrautgewichte nach 103 Tagen (pro Parzelle).

| Produkt | kg A. S. pro ha | Unkrautgewicht g |
|---|---|---|
| G 27692 | 1 | 360 |
| | 2,5 | 45 |
| | 5 | 120 |
| G 27901 | 1 | 4870 |
| | 2,5 | 3490 |
| | 5 | 1680 |
| G 28279 | 1 | 5525 |
| | 2,5 | 5370 |
| | 5 | 2480 |
| G 25804 | 1 | 4643 |
| | 2,5 | 4545 |
| | 5 | 2390 |
| CMU | 1 | 4860 |
| | 2,5 | 3265 |
| | 5 | 1105 |
| unbehandelt I | – | 4555 |
| II | - | 5040 |
| III | – | 4114 |

Die Wirkung von G 27692 wird besonders deutlich, wenn wir die wichtigsten in den unbehandelten Parzellen vorhandenen Unkräuter mit den überlebenden in den behandelten Flächen vergleichen (Tabelle IV)

Von besonderer Bedeutung für die praktischen Verwendungsmöglichkeiten ist die Tatsache, dass die schon bei G 25804 beobachtete Toleranz gegenüber gewissen Kulturpflanzen[1] trotz der stärkeren Aktivität auch bei G 27692, G 27901 und G 28279 erhalten bleibt. Nach den bisherigen Erfahrungen zeichnet sich besonders Mais durch eine ausgesprochen geringe Empfindlichkeit

*A*

*B*

*C*

Baumwolle und Mais aus einem Preemergenceversuch im Gewächshaus. Bei *A* und *B* links 10 kg/ha, rechts 5 kg/ha. *A:* G 27692, *B:* CMU, *C:* unbehandelt.
Aufnahme: 47 Tage nach Aussaat und Applikation.

*Tabelle IV.* Verteilung der wichtigsten Unkräuter in den mit G 27692 behandelten und unbehandelten Parzellen.

| Unkrautart | Pflanzengewicht (in g) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Mittelwert aus den 3 unbehandelten Parzellen | G 27692 | | |
| | | 1 kg/ha | 2,5 kg/ha | 5 kg/ha |
| *Sonchus arvensis* L. . . . . | 2090 | 0 | 0 | 0 |
| *Chenopodium album* L. . . | 570 | 0 | 0 | 0 |
| *Polygonum aviculare* L. . . | 330 | 0 | 0 | 11 |
| *Ranunculus repens* L. . . . | 50 | 20 | 25 | 10 |
| *Convolvulus Sepium* L. . . | 400 | 0 | 0 | 0 |
| *Plantago lanceolata* L. . . . | 160 | 0 | 0 | 63 |
| *Trifolium pratense* L.* . . . | 0 | 0 | 0 | 11 |
| *Agropyron repens* P. B.** . | 0 | 340 | 20 | 25 |
| diverse Gräser . . . . . | 290 | 0 | 0 | 0 |
| Diverses . . . . . | 680 | 0 | 0 | 0 |

* Als Einzelpflanzen nur in dieser und einer mit CMU behandelten Parzelle vorhanden.

** Unregelmässig verteilt; war nur in einzelnen Parzellen vorhanden und fehlte zum Beispiel in allen unbehandelten vollständig.

gegenüber relativ hohen Dosen dieser Herbizide aus. Auch Baumwolle erwies sich als wenig empfindlich (Abb. 1).

Die guten Ergebnisse an Mais im Gewächshaus konnten inzwischen auch im Freiland mehrfach reproduziert werden.

A. Gast, E. Knüsli und H. Gysin

*Aus den Forschungslaboratorien der J. R. Geigy A. G. Basel, den 15. Januar 1956.*

*Summary*

Further investigation on triazine-compounds led us to considerably more phytotoxic compounds than 2-chloro-4,6-bis-(diethyl-amino)-s-triazine (G 25804), three of which were field-tested. 2-chloro-4,6-bis-(ethyl-amino)-s-triazine (G 27692) showed a particularly good herbicidal activity and a considerable tolerance versus corn and cotton. From these preliminary tests G 27692 seems to be a promising overall toxic as well as a selective pre- and post-emergence herbicide for corn and cotton.

## Sur l'apogéotropisme du Phycomyces

Si les travaux portant sur la physiologie du *Phycomyces Blakesleeanus* Burgeff atteignent un nombre élevé[1], ceux qui traitent de son géotropisme sont, au contraire, peu nombreux[2] et fort anciens[3]. Ayant à disposition des souches de ce champignon[4], j'ai entrepris un certain nombre d'expériences relatives à l'action de la pesanteur sur la croissance du sporangiophore, dont quelques-unes font l'objet du présent travail.

Une suspension de spores, conservée à + 4°C, à l'obscurité, est déposé aseptiquement, dans des godets cylindriques remplis de milieu nutritif (M. de Coon, modifié, pH 6,0). La culture se poursuit à l'abri de toute lumière (Temp. 20°C ± 0,5; Humid. 75% ± 5). Les mesures sont faites à l'aide du «shadowgraphe» et le matériel éliminé immédiatement après observation.

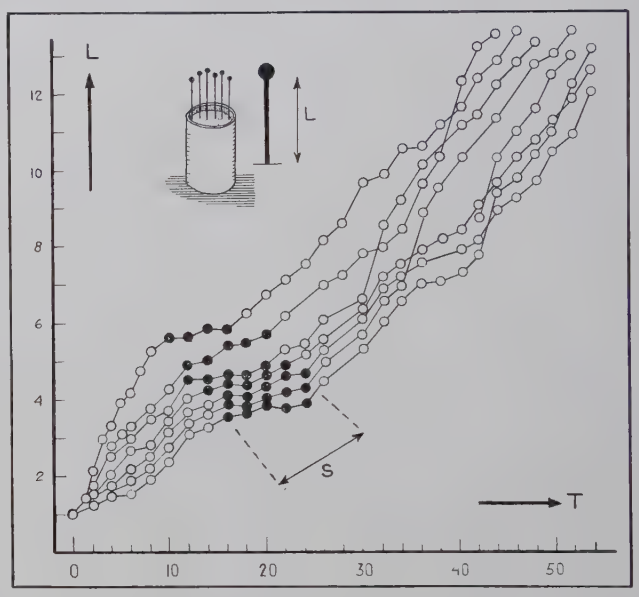



Fig. 1. Allongement des sporangiophores.
*L* longueur en mm, *T* temps en h.

*Essais 1:* Quatre jours après l'ensemencement, les sporangiophores qui mesurent approximativement 1 mm sont seuls conservés pour la détermination de leur croissance. La Figure 1 qui représente les mesures faites sur 7 séries de 40 sporangiophores, autorise les remarques suivantes: a) le sporangiophore s'allonge assez rapidement les 10 premières heures; b) la croissance ralentit

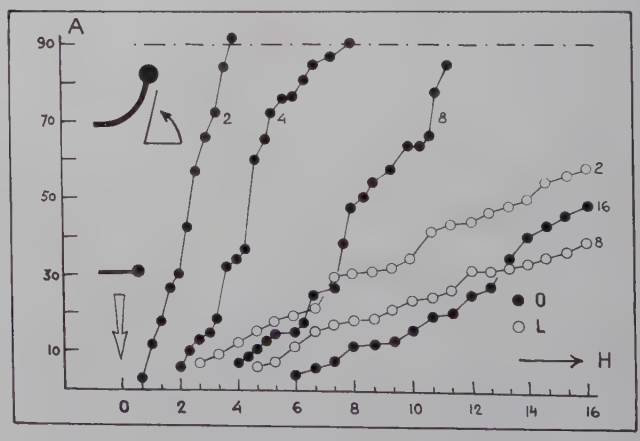



Fig. 2. Réactions apogéotropiques des sporangiophores.
*A* angle de courbure en degrés, *H* temps en h.
Les chiffres (*2, 4, 8, 16*) correspondent à la longueur du sporangiophore au moment où il est placé horizontalement. *O* obscurité totale, *L* pré-traitement lumineux (½ h).

[1] W. H. Schopfer, *Plants and vitamins* (Chronica Botanica Waltham, 1943).

[2] V. G. Lilly and H. L. Barnett, *Physiology of the Fungi* (Mc Graw-Hill, New York, 1951).

[3] F. Elfving, Act. Soc. Fernica *12*, 93 (1880). – F. Czapek, Jahrb. wiss. Bot. *27*, 243 (1895). – F. Schwarz, Arb. bot. Inst., Tübingen *1*, 53 (1881).

[4] Je veux exprimer ma gratitude au prof. M. Delbrück (Calif. Inst. of Technology, Pasadena) pour sa complaisance; mes remerciements s'adressent aussi à M. L. Labouriau.

ensuite (c'est à ce moment que se développe le sporange)[5]; c) puis la croissance du sporangiophore reprend. Ces résultats confirment toute une série de recherches relatives à la croissance du Phycomyces[5].

*Essais 2:* Les sporangiophores sont placés horizontalement lorsqu'ils mesurent respectivement 2, 4, 8 ou 16 mm. La Figure 2 (*O*) qui représente les variations de l'angle de courbure (entre l'axe du sporangiophore et l'horizontale; chaque point correspond à la moyenne de 100 mesures) permet les conclusions suivantes: a) tous les sporangiophores présentent un géotropisme négatif; b) les temps de présentation et de réaction sont d'autant plus faibles que les sporangiophores sont plus courts; c) la géosensibilité est donc maximum lorsque les sporangiophores sont dans leur première phase de croissance (avant que les sporanges ne soient formés).

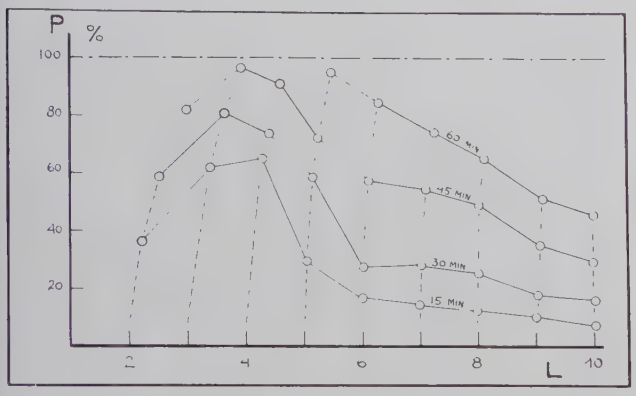



Fig. 3. Nombre de sporangiophores réagissant apogéotropiquement. *P* (%) pour-cent des sporangiophores présentant une courbure supérieure à 5°. *L* longueur des sporangiophores au moment de l'excitation.

*Essais 3:* Les champignons sont éclairés ½ h (lumière blanche: 60 W, 650 lm, 150 lux; distance: 25 cm; rayons parallèles à l'axe des sporangiophores), juste avant d'être placés horizontalement. Sous l'action de ce prétraitement lumineux (Fig. 2, *L*), les temps de présentation et de réaction sont considérablement accrus. Cette perte de géosensibilité pourrait être interprétée par la photoinactivation des auxines telle qu'elle fut analysée chez quelques plantes supérieures[6].

*Essais 4:* Des sporangiophores, longs de 2 à 10 mm, sont disposés horizontalement. Toutes les 15 min, on détermine le % des champignons qui ont répondu par une courbure (supérieure à 5°) à l'excitation gravitique. De la Figure 3, qui rend compte de ces essais (chaque point est une moyenne de 120 mesures), on peut tirer les conclusions suivantes: a) les sporangiophores mesurant de 3 à 4 mm sont ceux qui répondent le plus rapidement à l'excitation gravitique; b) pour les sporangiophores plus longs (ceux dont le sporange est déjà formé), le temps de réaction est nettement supérieur.

Ainsi l'apogéotropisme du Phycomyces paraît lié à la croissance de son sporangiophore et à la formation de son sporange. Il est probable que les auxines, qui président au développement du Phycomyces[7], soient responsables des variations de géosensibilité observées.

P. E. Pilet

*Kerkhoff Department of Biology, California Institute of Technology, Pasadena et Institut de Botanique, Université de Lausanne, le 4 janvier 1956.*

*Summary*

Under definite conditions of culture, growth of sporangiophore of Phycomyces has been investigated by Shadowgraphic method. During sporange formation, the rate of growth is the smallest (Fig. 1). The apogeotropic sensitivity of sporangiophores is the greatest before sporange formation; presentation and reaction times increase with age and strongly with light pre-treatment (Fig. 2, 3). Auxin could be responsible for apogeotropic reactions of Phycomyces.

[5] G. H. Banbury, J. exp. Bot. *3*, 86 (1952). – E. S. Castle, J. gen. Physiol. *9*, 407 (1927); Amer. J. Bot. *29*, 664 (1942). – M. Grosper, Bot. Zbl. *36*, 414 (1919). – A. N. J. Heyn, Protoplasma *25*, 372 (1936). – L. J. J. Pop, Proc. Acad. Sci., Amsterdam *41*, 661 (1938). – P. A. Roelofsen et W. L. Houwink, Acta bot. Neederland *2*, 218 (1853).

[6] L. Brauner, Naturwissenschaften *40*, 23 (1953). – F. Franck, Thesis, Tübingen (1951). – A. W. Galston, Bot. Rev. *16*, 361 (1950). – P. E. Pilet, Bull. Soc. bot. suisse *60*, 6 (1950); Bull. Soc. vaud. Sci. nat. *65*, 197 (1952).

[7] F. Kögl et B. Verkaaik, Z. physiol. Chem. *280*, 162 (1944). – R. Pohl et W. Rother, Biol. Zbl. *72*, 364 (1953).

## Occurrence of Dictyosteliaceae in the Rhizosphere of Plants in Southern India

The Dictyosteliaceae are generally considered to represent a group of coprophilous organisms, since frequently such material represented mainly the source of isolates investigated by many[1]. It was Krzemienewskis[2] who pointed out that *Dictyostelium mucoroides* Brefeld could be obtained from cultivated soils in Poland. Later Raper and Thom[3] isolated the same organism from soils of United States and Singh[4] from soils in England.

There is no report of the occurrence of these organisms in soils of India. In the course of investigations on the rhizosphere microflora of plants the author very frequently observed *D. mucoroides* Brefeld in bacterial plates incubated for a period well over two weeks. With a view to investigate the occurrence of these organisms in soils of South India, 35 soil samples (20 of cultivated and 15 of uncultivated) and rhizosphere soils of 48 species of crop plants and common weeds growing in above soils were analysed. Soil suspensions prepared by agitating 10 gm of soil or 5 gm of root samples in 100 ml of sterile tap water were streaked on $^1/_4$ strength of hay infusion and dung infusion agar[5]. In addition to the above media lactose-peptone agar[6] and *Aerobacter* circles[4] were also employed. Root bits of different plants were incubated on all the above media at laboratory temperature (28–34°C) and the observations extended for a period of one month. The number of soils and species of plants yielding different members of Dictyosteliaceae are presented in the Table.

[1] O. Brefeld, Abh. Senckenberg naturf. Ges. Frankfurt *7*, 85 (1869). – F. W. Olive, Proc. Boston Soc. Nat. Hist. *30*, 451 (1902).

[2] H. and S. Krzemieniewski, Acta Soc. bot. Poloniae *4*, 141 (1927).

[3] K. B. Raper and C. Thom, J. Wash. Acad. Sci. *22*, 93 (1932).

[4] B. N. Singh, J. gen. Microbiol. *1*, 11 (1947).

[5] K. B. Raper, J. agric. Res. *55*, 289 (1937).

[6] K. B. Raper, Quart. Rev. Biol. *26*, 169 (1951).

| Species of Dictyosteliaceae | Cultivated soils | Uncultivated soils | Rhizosphere soils |
|---|---|---|---|
| *Dictyostelium mucoroides* Brefeld | 18 | 4 | 36 |
| *D. discoideum* Raper | 2 | 0 | 6 |
| *D. minutum* Raper | 3 | 1 | 8 |
| *D. purpureum* Olive | 2 | 0 | 8 |
| *Polysphondylium pallidum* Olive | 6 | 2 | 18 |
| *P. violaceum* Olive | 2 | 2 | 7 |

*D. mucoroides* Brefeld was found to be present in many soils. Greater number of isolations were made from cultivated than uncultivated soils. In uncultivated soils, rhizosphere samples of weeds in many instances yielded species of Dictyosteliaceae.

Hay infusion, dung infusion and lactose-peptone agar were found to be best suited for the isolation of different species. In many instances 2–3 species were isolated from individual samples. Rhizosphere sample of pigeonpea (*Cajanus cajan*) in one instance yielded 4 species and that of pea-nut (*Arachis hypogea*) 5 species, which is indicative of the abundance of these forms in the cultivated soils here. *Aerobacter* circles invariably yielded 2 starins of *D. mucoroides* Brefeld one of which seemed to agree with *D. giganteum* Singh[4].

It is of interest to note that this is perhaps the first time that the Dictyosteliaceae are reported from uncultivated soils. The results of the writer emphasize that the members of this group are typically soil inhabitants and being predatory by nature, the rhizosphere of plants with divers groups of bacteria in great abundance might be one of their important ecological habitats.

Work on the growth of some members of Dictyosteliaceae in pure mixed cultures with bacteria isolated from soils and rhizosphere of different plants is underway and the details of these investigations will be reported elsewhere.

I am thankful to Professor T. S. Sadasivan for his help and advice, to Professor Kenneth B. Raper of The University of Wisconsin for confirming the identity of some of the isolates and to Dr. H. G. Thornton, F. R. S. of the Rothamsted Agricultural Experiment Station for the culture of *Aerobacter* (1912) used in the above investigation.

V. Agnihothrudu

*University Botany Laboratory, Madras–5, December 9, 1955.*

*Zusammenfassung*

Sechs Arten von Dictycosteliaceae sind in Indien zum ersten Mal aus bebautem und unbebautem Boden isoliert worden. Ihr Vorkommen in nichtkultivierten Böden war bis jetzt unbekannt. Die Rhizosphäre der Pflanzen scheint ein wichtiges Habitat dieser Organismen zu sein.

## Specificity of Anti-RH Serum Inhibition by Lipid Extracts as Determined by Quantitative Nitrogen Assays

Recovery of a lipid fraction of human red cells which would inhibit anti-Rh serums was reported by Carter[1]. This fraction, originally extracted with ether, now is obtained by precipitation of one volume of pooled Rh positive red cells with 3 volumes alcohol, separation of the precipitate by filtration after an overnight period, followed by extraction of the precipitate by 3 volumes of dichloromethane with periodic shakings during at least 6 h at room temperature. The separation of the dichloromethane extract by filtration is followed by evaporation of the liquid under a hood before an electric fan. The lipid residue shows a comparable yield and properties similar to extracts described previously[2].

Work was undertaken to learn the specificity of this extract obtained from Rho (D) positive red cells in relation to anti-Rh (anti-D) serum. Aliquots of the lipid, 50 mg each, were weighed in Pyrex 125 × 15 mm tubes. To one tube was added 1 ml high titered anti-Rh serum; to a second tube 1 ml pooled normal serum. These serums must be free of bacterial contamination. A third tube held lipid plus 1 ml 0·85% saline. These three tubes were placed in a 50°C water bath for 10 min, shaken vigorously and put in a 37°C water bath for 30 min. Then the tubes were kept in an ice bath for 10 min and centrifuged at 4000 rpm for 10 min. The serums were removed with capillary pipettes and saved. Then 5 ml saline was added to each tube, mixed and again the tubes were placed in ice water and centrifuged. This washing was repeated 5 times. Washings from analyses of several lots were tested for nitrogen. The fifth wash was invariably negative. Also the procedure was repeated using magnesium chloride (5%) for washing to insure against loss of nitrogen. Results were closely corroborative.

Total nitrogen determinations were run on the contents of each tube after the fifth washing. Various methods were tried: Kabat and Mayer[3] and Lanni, Dillon, and Beard[4]. The modified method used is: (1) Remove all water from the lipid with a capillary pipette without disturbing the layer. (2) To each tube add 1 ml digestion mixture (4·46 ml saturated copper sulfate plus 1 lb. reagent grade sulfuric acid), 0·5 g reagent grade, low N content potassium sulfate and one glass bead. (3) All tubes are placed over micro burners to digest until clear. After the vapor boils off, glass marbles are put on top of the tubes. Low boiling is continued for 30 min after complete clearing. (4) Cool the tubes; place in ice bath. (5) Add 5 ml distilled water; mix for complete solution. (6) Quantitatively transfer the contents of each tube to its 100 ml flask containing 25 ml distilled water. Add 20 ml Nessler's reagent[5] slowly, with swirling. (7) Bring to 100 ml with distilled water, mix by inversion, allow to stand for 10 min, read transmittance with a Leitz photelometer at 460 m$\mu$ wavelength. A reagent blank is run simultaneously with the lipid aliquots. A curve is constructed from results obtained with tests run as above on serial dilutions in 100 ml volumetric flasks from a stock solution of ammonium sulfate (30 $\mu$g per ml, made by dissolving 0·142 g dry reagent grade ammonium sulfate in 1 l distilled water).

Use of this method to determine nitrogen in known amounts of choline hydrochloride shows that the process completely digests choline. Two ways were used

[1] B. B. Carter, Amer. J. clin. Path. *17*, 646 (1947).

[2] B. B. Carter, J. Immunol. *61*, 79 (1949).

[3] E. A. Kabat and M. M. Mayer, *Experimental Immunochemistry* (Charles C. Thomas, Springfield, Ill., 1948), p. 282.

[4] F. Lanni, M. L. Dillon, and J. W. Beard, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *74*, 4 (1950).

[5] F. C. Koch and T. L. McMeekin, J. Amer. chem. Soc. *46*, 2066 (1924).

Results of Nitrogen Determinations and Serum Adsorptions (50 mg lipid)

| | Lipid Extract ($\mu$g N) | Lipid with Normal Serum ($\mu$g N) | Lipid with Anti-Rh Serum ($\mu$g N) | Unadsorbed Anti-Rh Serum (titer units) | Adsorbed Anti-Rh Serum (titer units) |
|---|---|---|---|---|---|
| Rh + Lot # | | | | | |
| 41 | 370 | 370 | 680 | 2560 | 80 |
| 42 | 340 | 360 | 460 | 2560 | 160 |
| 43 | 200 | 300 | 430 | 2560 | 160 |
| 44 | 300 | 480 | 970 | 2560 | 80 |
| 45 | 330 | 620 | 1120 | 2560 | 40 |
| Rh — Lot # | | | | | |
| 6 | 420 | 440 | 430 | 2560 | 2560 |
| 7 | 280 | 600 | 580 | 2560 | 2560 |
| 8 | 250 | 400 | 440 | 2560 | 1280 |
| 9 | 220 | 340 | 300 | 2560 | 2560 |
| 10 | 220 | 300 | 280 | 2560 | 2560 |

to determine the accuracy of the method: first, by comparison of two series of known nitrogen values run independently with this same method and, second, by using a single series of known values run with two different methods, the one described above and a distillation technique. The standard difference of the means in these series is not significant.

Results with 30 different preparations of lipid from Rh positive cells indicate that, although there is some non-specific adsorption of both anti-Rh and normal serums on the exposed lipid particle, the anti-Rh serum was without a single exception adsorbed to a greater extent than was the normal serum. A mean of 400 $\mu$g was found for the difference in N adsorption of normal serum and anti-Rh serum in the 30 preparations. 12 lipid fractions prepared from Rh negative (cde) red cells adsorbed a mean of only 30 $\mu$g more anti-Rh serum than normal serum; several lots adsorbed slightly less of the anti-Rh serum than of the normal serum. The difference between adsorption of anti-Rh on the Rh positive lipid particle and on the Rh negative lipid particle is highly significant ($t$ of 3·27 at the 1% level of confidence). Titrations of anti-Rh serums before and after exposure to the lipid particles with hemagglutinating techniques, using calibrated pipettes, show several fold drops in titer with Rh positive lipid exposure and slight fall, if any, with the Rh negative lipid. Subjective error was avoided through one of us providing the other with unknown lipid samples for analysis, the origin of each determinable only by reference to a key.

It seems reasonable to conclude that the greater degree of adsorption of antibody nitrogen on the lipid derived from the Rh positive red cells is a specific effect. The Table shows the total nitrogen determinations in relation to 5 different lots of Rh positive lipid in sequence and 5 different Rh negative lots, together with the serum titrations.

Bettina B. Carter[6] and J. C. Harris

*Department of Microbiology, State University of New York, College of Medicine at Syracuse and Veterans Administration Hospital, Syracuse, N.Y., January 18, 1956.*

*Zusammenfassung*

Eine Reihe der Lipidfraktionen von Rh-positiv und Rh-negativ (D-positiv und D-negativ) roten Zellen menschlichen Blutes wurde der Wirkung von anti-Rho Serum (anti-D) ausgesetzt. Die dabei adsorbierte Menge von Stickstoff wurde quantitativ bestimmt. In jedem Fall adsorbierten die Lipide von Rh-positiv roten Zellen mehr Antikörperstickstoff als die aus Rh-negativ roten Zellen extrahierten Lipide. Man darf wohl daraus schliessen, dass der höhere Grad der Adsorption von Antikörperstickstoff auf Lipiden von Rh positiv roten Zellen ein spezifischer Effekt ist.

[6] Present address: Department of Biology, Western Michigan College, Kalamazoo, Michigan.

## Is Lysine the Source of the Pyridine Ring in Nicotine?[1]

The suggestion of Robinson[2] that a genetic relationship exists between ornithine and pyrrolidine rings occurring in many alkaloids has recently received confirmation in the case of nicotine by the work of several groups[3]. Robinson[4] had previously called attention to a similar relationship between lysine and the pyridine ring, and noted the presence of both ornithine and lysine skeletons in nicotine.

Leete[5] has proposed a tentative biogenetic scheme for nicotine, based on modifications of the suggestions of Robinson, which again suggests the possibility of lysine as a basic source of the pyridine ring. However, we have now obtained data, using (+)-lysine-$\varepsilon$-$^{15}$N-dihydrochloride and L(+)-lysine-$^{14}$C, which indicate that lysine is not incorporated as such into the nicotine molecule by root cultures of *Nicotiana tabacum* var. Turkish, grown under sterile conditions as outlined elsewhere[6]. In one experiment, 66·2 mg of the $^{15}$N-lysine was fed to 100 root cultures. These were harvested[6] after one week and gave 31 mg of nicotine. A portion of this nicotine was converted to gaseous nitrogen and determined mass spectrometrically. The remainder was oxidized to nicotinic acid by means of nitric acid and analyzed similarly. The analytical results for these compounds appear in

[1] Research performed under the auspices of the United States Atomic Energy Commission.

[2] R. Robinson, J. chem Soc. 876 (1917).

[3] E. Leete, L. Marion, and I. D. Spencer, Can. J. Chem. *32*, 116 (1954). – E. Leete, Chem. and Ind. *19*, 537 (1955). – L. J. Dewey, R. V. Byerrum, and C. D. Ball, Biochim. et Biophys. Acta *18*, 141 (1955).

[4] R. Robinson, Proc. Univ. Durham Phil. Soc. *8*, 1, 14 (1927).

[5] E. Leete, Chem. and Ind. *19*, 537 (1955).

[6] R. F. Dawson, D. R. Christman, and R. C. Anderson, J. Amer. chem. Soc. *75*, 5114 (1953).

the Table. The pyrrolidine nitrogen of the nicotine is seen to contain 0·774 atom-% excess $^{15}N$, 7 times as much excess $^{15}N$ as does the pyridine nitrogen, and the isotopic incorporation is very low.

To exclude the possibility that this result might have been caused by elimination of the terminal nitrogen atom of the lysine during the formation of a ring compound, by analog with some other biological systems[7], 4·0 mg L(+)-lysine, uniformly labeled in the carbon chain with $^{14}C$, was administered to 20 tobacco root cultures, using the same techniques as before. The cultures were harvested after 5 days and yielded 5·7 mg of nicotine as it dipicrate. The specific radioactivities of the compounds involved are shown in the Table:

| | $^{15}N$ atom-% excess | $^{14}C$ $\mu c$/mmole |
|---|---|---|
| Isotopic L(+)-lysine | 49·2 (in one position) | 153 |
| Nicotine . . . . . | 0·427 | 0·008,2* |
| Nicotinic acid . . . | 0·110 | 0·002,6* |

* Corrected for dilution with carrier.

In both feedings of the labeled lysines, the transfer of isotope from lysine to nicotine was of very low order of magnitude, and there was a pronounced preference for isotopic enrichment of the pyrrolidine rather than the pyridine ring. These results indicate that lysine is apparently sufficiently removed from nicotine in the chemical economy of the plant that it not only fails to enter the pyridine ring of nicotine directly, but parts of the lysine molecule actually appear in the pyrrolidine ring in preference to the pyridine ring.

We wish to express our appreciation to Drs. S. C. Madden and F. M. Sinex for generous gifts of the labeled lysines.

A. A. Bothner-By, R. F. Dawson, and D. R. Christman

*Departments of Chemistry and Biology, Brookhaven National Laboratory, Upton, Long Island, New York, November 18, 1955.*

*Zusammenfassung*

Gibt man L(+)-Lysin-$\varepsilon$-$^{15}N$ oder in allen Stellungen mit $^{14}C$ markiertes L(+)-Lysin zu keimfreien Kulturen von abgeschnittenen Wurzeln von *Nicotiana tabacum*, so erzeugen die Wurzeln Nikotin, welches kleine Mengen $^{15}N$ oder $^{14}C$ enthält. Ferner enthält das Nikotin mehr $^{15}N$ oder $^{14}C$ im Pyrrolidinring als im Pyridinring. Lysin liegt daher nicht auf dem direkten biogenetischen Weg zum Nikotin.

[7] H. J. Vogel and B. D. Davis, J. Amer. chem. Soc. *74*, 109 (1952).

## Histaminantagonistische Wirkungen von Adrenochrom-Monosemicarbazon[1]

Bei Versuchen an der Meerschweinchenhaut beobachteten wir histaminantagonistische Wirkungen von Adrenochrom-Monosemicarbazon (*ACHR*). Dieser Effekt wurde quantitativ mit der histaminantagonistischen Wirkung der spezifischen Antihistaminika (*A.H.*) Pyrilamin maleat (NNR)[2] und Antazolin methansulfonat (NNR)[3] verglichen. Dabei wurde der Einfluss sowohl auf die durch «exogenes» als auch auf die durch «endogenes» in der Haut selbst freigesetztes Histamin hervorgerufene vaskuläre Permeabilitätssteigerung geprüft.

*Methode.* Weisse Meerschweinchen von etwa 300 g Gewicht erhielten 2 ml/kg einer 1%igen Lösung von Trypanblau «Grübler» intravenös. 4–5 min danach wurden in die enthaarte Rückenhaut links und rechts parallel zur Mittellinie intrakutan injiziert: Histamin-2HCl als «exogenes Histamin» ($10^{-5}$ g/ml); Verbindung 48/80 als «endogenes Histamin» freisetzende Substanz[4] in äquieffektiver Konzentration ($10^{-4,5}$ g/ml); Histamin + Antagonist; 48/80 + Antagonist; physiologische Kochsalzlösung. Die Injektionsvolumina betrugen 0,05 ml, alle Wirkstoffe wurden unmittelbar vor dem Versuch in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Die Bestimmung der Wirkungsstärke der intrakutanen Injektionen erfolgte 10–15 min danach durch Bewertung der Intensitätsstufe des Farbstoffaustritts in den Quaddelbereichen. Unbeeinflusste Reaktionen bestanden in einem kreisförmigen scharf begrenzten Fleck von gleichmässig dunkelblauer Farbe. Bei «fast vollständigem Antagonismus» fand sich im Injektionsbereich angedeutet kreisförmige unscharf begrenzte diffuse oder fleckförmig vereinzelte, noch sehr schwach hellblaue Anfärbung.

*Ergebnisse.* Die Wirkung jeder geprüften Antagonistenkonzentration wurde aus mindestens 10 Einzelinjektionen bestimmt. Die Konzentrationen[5] der Antagonisten, welche bei gleichzeitiger intrakutaner Injektion den Farbstoffaustritt fast vollständig verhinderten, betrugen für

Pyrilamin gegen Histamin: $10^{-6}$ g/ml, gegen 48/80: $10^{-3,5}$ gml; Antazolin gegen Histamin: $10^{-5}$ g/ml, gegen 48/80: $10^{-3,5}$ g/ml; *ACHR* gegen Histamin: $10^{-3,4}$ g/ml, gegen 48/80: $10^{-3,4}$ g/ml.

Gegenüber «exogenem Histamin» wirkt Pyrilamin demnach 10mal stärker als Antazolin und 400mal stärker als *ACHR*. Gegenüber 48/80 («endogenem Histamin») sind beide *A.H.* gleich wirksam, Pyrilamin jedoch erst in etwa 300mal und Antazolin in etwa 30mal höherer Konzentration als gegenüber «exogenem Histamin». *ACHR* hemmt in der gleichen Konzentration die Wirkung «exogenen» und «endogenen Histamins» gleich stark. *ACHR* ist demnach gegenüber «endogenem Histamin» annähernd ebenso wirksam wie die spezifischen *A. H.*

In einer zweiten kleineren Versuchsreihe wurden die antagonistischen Substanzen zuerst intraperitoneal verabreicht. Etwa 35–40 min danach wurde Trypanblau intravenös, anschliessend an jedem einzelnen Versuchstier sowohl Histamin als auch 48/80 in verschiedenen jeweils äquieffektiven Konzentrationen intrakutan injiziert.

*Ergebnisse.* Die Wirksamkeit der Antagonisten ergab sich aus dem Verhältnis der am nichtvorbehandelten und am vorbehandelten Tier gleich wirksamen Konzentrationen von Histamin beziehungsweise 48/80; dieses betrug nach

$10^{-5,5}$ g/g Tier Pyrilamin[5] für Hist. 1:10–32, für 48/80 1:3,2;
$10^{-4,5}$ g/g Tier Antazolin[5] für Hist. 1:10–32, für 48/80 1:3,2;
$10^{-4,8}$ g/g Tier *ACHR* für Hist. 1:3,2–10, für 48/80 1:3,2.

[1] «Adrenoxyl» ORION Helsinki, unter Lizenz LABAZ Brüssel.

[2] Mepyramin. maleat. NFN.

[3] Imidamin. methansulfonat. NFN.

[4] W. D. M. Paton, Brit. J. Pharmacol. *6*, 499 (1951).

[5] Die Konzentrations- bzw. Dosisangaben beziehen sich auf die Salze.

Pyrilamin wirkt auch hier 10mal stärker als Antazolin und beide *A.H.* hemmen die Wirkung «exogenen Histamins» stärker als die Wirkung von 48/80. *ACHR* wirkt etwas schwächer antagonistisch gegenüber «exogenem Histamin», ist jedoch gegenüber 48/80 ebenso stark wirksam wie die doppelte Dosis Antazolin und die 5mal niedrigere Dosis Pyrilamin. In dieser Versuchsanordnung erreicht *ACHR* demnach annähernd die Grössenordnung der Wirksamkeit spezifischer *A.H.*

*Diskussion.* Im Vergleich zu den Ergebnissen bei intrakutaner Applikation zeigt *ACHR* bei intraperitonealer Anwendung eine deutliche relative Zunahme der antagonistischen Wirkungsstärke. Diese Beobachtung wird durch folgende Überlegung erweitert: Bei Annahme einer annähernd gleichmässigen Verteilung der intraperitoneal injizierten Substanzen im Organismus innerhalb des Versuchszeitraumes kann die aus der Dosis berechnete Konzentration in g/g Gewebe überschlagsweise mit der Konzentration in g/ml bei intrakutaner Applikation verglichen werden. Dabei ergibt sich für die spezifischen *A.H.* gute Übereinstimmung der Wirkung bei beiden Applikationsarten. Die theoretische Gewebskonzentration von intraperitoneal injiziertem *ACHR* beträgt dagegen weniger als $^1/_{20}$ der bei intrakutaner Anwendung wirksamen Konzentration. Diese beträchtliche Differenz lässt vermuten, dass am Zustandekommen der antagonistischen Wirkung von intraperitoneal gegebenem *ACHR* auch indirekte Mechanismen wesentlich beteiligt sind. Es wird für möglich gehalten, dass die Nebennierenrinden-stimulierende Wirkungseigenschaft von *ACHR*[6] dabei eine Rolle spielt.

Die erheblichen Wirksamkeitsdifferenzen der spezifischen *A.H.* gegenüber intrakutan injiziertem Histamin und 48/80 führen zu der Annahme, dass der Effekt des «Histaminfreisetzers» 48/80 nur zum Teil auf die Wirkung freigesetzten Histamins zurückzuführen ist. Neben den Auswirkungen primärer Zellschädigungen wäre eine Freisetzung auch andersartiger, nicht mit Histamin identischer Wirkstoffe, neben Histamin in Betracht zu ziehen. Der Mechanismus der hier beschriebenen antagonistischen Wirkung von *ACHR* wird daher eher in einer primären mittelbaren und unmittelbaren Beeinflussung der Gefässpermeabilität vermutet als in einer spezifischen Blockierung von Histamin. Dieser Annahme entsprechen die Beobachtungen anderer Autoren, dass durch *ACHR* die Gefässpermeabilität vermindert[7] und die Kapillarresistenz erhöht[8] wird.

Die erweiterte Arbeit wird ausführlich an anderer Stelle publiziert.

Wir danken Dr. E. J. de Beer, The Wellcome Research Laboratories, Tuckahoe 7, N.Y., für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen der Verbindung 48/80.

J. Alberty und Riitta Takkunen

*Pharmakologisches Laboratorium der Arzneimittelfabrik «Lääketehdas Orion O.Y.», Helsinki, Finnland, den 24. Oktober 1955.*

*Summary*

In experiments on the skin of the guinea pig, the monosemicarbazone of adrenochrome is shown to prevent increase of vascular permeability due to intradermal injection of histamine or "endogenous histamine" liberating substance 48/80. By simultaneous intradermal injection with histamine or 48/80, it is equally effective as specific antihistamines in suppressing the skin reaction to 48/80, whereas the antihistamines are considerably stronger antagonists to exogenous histamine. Administered intraperitoneally, adrenochrome monosemicarbazone shows about the same order of antagonistic efficacy as the typical antihistamines. The findings are briefly discussed.

[6] H. van Cauwenberge, J. Lecomte, P. Fischer, M. Vliers und J. Goblet, Arch. internat. Pharmacodyn. *93*, 317 (1953).

[7] J.-L. Parrot, C. r. Soc. Biol. *144*, 819 (1949).

[8] Z. M. Bacq *et al.*, Arch. internat. Physiol. *57*, 295 (1944); *59*, 460 (1951). – J. Roskam *et al.*, Arch. internat. Pharmacodyn. *69*, 348 (1944); *74*, 162 (1947); J. Physiol. *108*, 1 (1949). – J. Lecomte und A. Herve, Arch. internat. Pharmacodyn. *79*, 109 (1949).

## A Binding Site for Histamine in Hog Pyloric Mucosa

Evidence is now so convincing that the bulk of the histamine in a tissue is normally contained in its mast cells[1], that interest tends to become focussed on possible exceptions to this rule. One such unusual location for histamine appears to be in the mucosa of the pyloric portion of hog stomach[2].

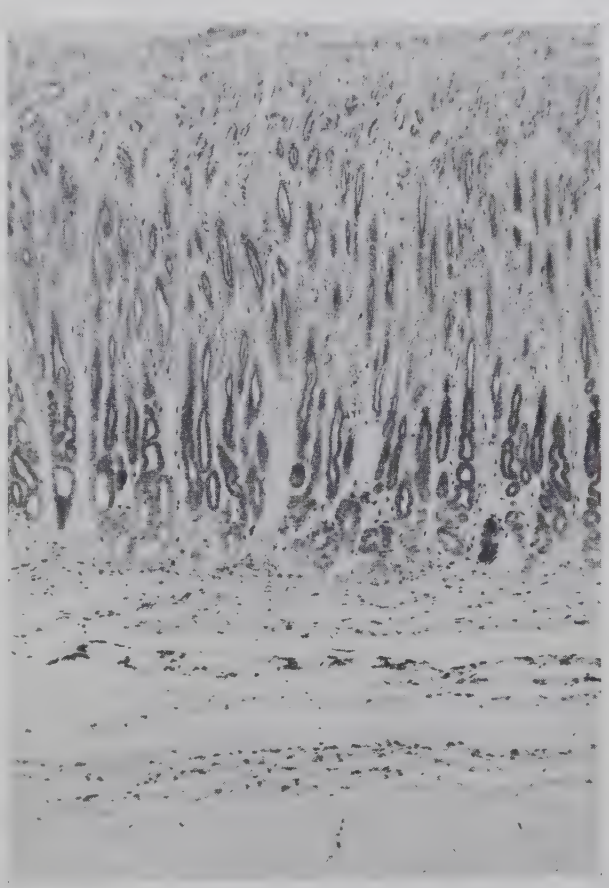


Fig. 1.—Paraffin section through mucosa and submucosa of pyloric portion hog stomach, fixed in Constantinides' fluid and stained with toluidine blue (× 55). The numerous dark spots in the submucosa are the mast cells. A few mast cells occur in the deeper mucosa between the mucus glands which also stain metachromatically with toluidine blue.

Figure 1 shows, at low magnification, a vertical section through the mucosa and submucosa of the pyloric portion of hog stomach, fixed in the fluid recommended for mast cells by Constantinides[3] and stained with 0·1% aque-

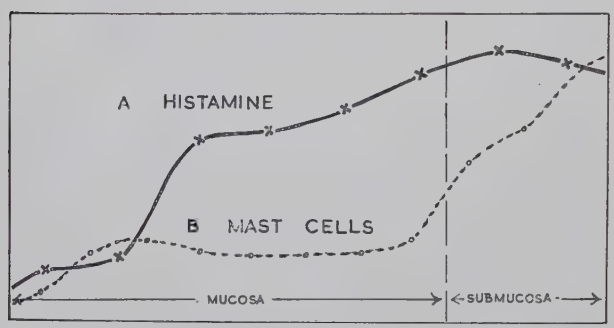
[1] J. F. Riley and G. B. West, J. Physiol. *120*, 528 (1953). – J. F. Riley, Pharmacol. Revs. *7*, 257 (1955).

[2] J. F. Riley and G. B. West, J. Physiol. *130*, 3P (1955).

[3] P. Constantinides, Science *117*, 505 (1953).

ous toluidine blue. Even at this magnification the dense accumulation of mast cells in the submucosa is clearly visible. Under high power these cells are seen to contain granules which stain metachromatically (purple to red), the largest cells being related to the vessels which traverse the middle of the submucosa. A few similar, though smaller, mast cells accompany the loose connective tissue upwards between the tubular pyloric glands. In view of the obvious differences in mast cell content of mucosa and submucosa it was of interest to determine the relative values for histamine in these two layers.

Mast cells were counted in the paraffin sections, using a binocular Watson microscope of standard tube length, eye-piece × 8, and objective × 50, giving a final magnification of 600 diameters. Figure 2 records the average number of mast cells per 20 fields at each of 11 levels, from the surface of the mucosa to the base of the submucosa. The underlying muscle was not examined in detail since preliminary observations had shown it to contain very few mast cells and very little histamine.




| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 18 | 22 | 67 | 67 | 78 | 90 | 100 | 93 | | |
| B | 2 | 5 | 6 | 5 | 5 | 5 | 5 | 6 | 12 | 14 | 22 |

Fig. 2.—Relative histamine values (*A*) and mast cell contents (*B*) at various depths in the mucosa and submucosa of hog pylorus. It is clear that the sharp inflection in each curve occurs at a different level. Something other than mast cells is binding histamine in the deeper mucosa.

Histamine was estimated in frozen sections at 8 levels in depth of the combined mucosa and submucosa (Fig. 2). Fresh tissue, stripped of its muscle, was cut, parallel to the surface, on the freezing microtome after the manner of Feldberg and Harris[4], each tissue slice being then rapidly weighed and placed in 10% trichloracetic acid for the extraction of its histamine. The subsequent assays were carried out either on the standard guinea pig ileum preparation or on the blood pressure of the atropinized cat.

If we consider first the findings for the submucosa, we see that the high mast cell content (average, 18 cells per field) has its counterpart in a correspondingly high value for histamine (average, 97 $\mu$g/g). This is in line with what we have found elsewhere. On the other hand, when conditions in the overlying mucosa are examined, it is evident that here the rapid fall off in the mast cell content (average, 5 cells per field) is *not* accompanied by a proportionate reduction in tissue histamine (average, 76 $\mu$g/g) until a region close to the surface of the mucosa is reached. There is, in fact, almost a fourfold difference between the histamine-mast cell ratios in the submucosa and in the deeper mucosa. As stated above, we have good reason for believing that the histamine in the submucosa is due to its high content of mast cells; hence it is clear that something other than mast cells must be binding the histamine in the mucosa.

The most obvious choice for this second component which binds histamine in hog pyloric mucosa is the mucin of the goblet cells lining the lower two-thirds of the pyloric glands. Indeed, there is direct evidence that gastric mucin can bind histamine[5]. Like the mast granules this deeper mucin also stains metachromatically with toluidine blue, as does an occasional strand of mucus lying free in the lumen of the stomach, whereas the mucin of the surface cells and most of the excreted mucus stain orthochromatically (blue) with toluidine blue. It is unfortunate that we have as yet no method for fixing the histamine *in situ* to demonstrate its presence directly by histochemical techniques. The association of histamine with the metachromatically-staining mucus is thus at present a matter of inference rather than proof.

Yet it must not be assumed that metachromasia with toluidine blue is itself an indication of the ability of a tissue to bind histamine, and there is nothing to suggest a functional relationship between mast cells and gastric mucin. Cartilage which exhibits intense metachromatism with toluidine blue binds very little histamine, and when sections of the present material are stained by conventional methods for mucin—Bismark brown, mucicarmine and mucihaematin—the goblet cells stain deeply and the mast cells not at all. The precise reason for the high histamine content of the deeper portion of hog pyloric mucosa is not yet clear.

J. F. Riley and G. B. West

*Department of Pharmacology and Therapeutics, Queen's College, Dundee, Scotland, December 28, 1955.*

*Zusammenfassung*

In verschiedenen Lagen der Mucosa und der Submucosa des Pylorusteils des Schweinemagens wurden Mastzellen gezählt und der Histamingehalt berechnet. Der hohe Histamingehalt lässt sich durch die entsprechend hohe Mastzellenzahl erklären. Die Mastzellenzahl fällt in der angrenzenden Mucosa steil ab, doch bleibt der Histamingehalt gleich hoch. Es ist möglich, dass in diesem Gewebe neben den Mastzellen auch das metachromatische Mucin der unteren Mucosa Histamin bindet.

[4] W. Feldberg and G. W. Harris, J. Physiol. *120*, 352 (1953).

[5] K. Neugebauer and J. Schmid, Wien, Z. inn. Med. *30*, 383 (1949).

## Zentrale vegetative LSD-Effekte

Das von Stoll und Hofmann[1] synthetisierte Diäthylamid der Lysergsäure (LSD 25) ist wegen seiner ausserordentlichen Wirksamkeit auf psychische Funktionen des Menschen schon seit Jahren Gegenstand psychiatrisch-experimenteller Untersuchungen. Im Vergleich zu den zahlreichen Veröffentlichungen über klinische Beobachtungen liegen über experimentell-pharmakologische LSD-Untersuchungen jedoch verhältnismässig wenig Arbeiten vor. Erst in neuerer Zeit hat das LSD

[1] A. Stoll und A. Hofmann, Helv. chim. Acta *26*, 944 (1943).

wegen seiner antagonistischen Wirkung gegenüber 5-Oxytryptamin an verschiedenen Testobjekten auch in der Pharmakologie vermehrtes Interesse gefunden. Verschiedene innerhalb der letzten 10 Jahre in unseren Laboratorien gewonnene Beobachtungen zeigen, dass LSD darüber hinaus noch Wirkungen anderer Art entfaltet. Über einen Teil dieser Untersuchungen wurde bereits berichtet[2]. Der Zweck dieser kurzen Mitteilung ist es, auf eine Reihe LSD-Wirkungen beim Kaninchen hinzuweisen, die uns in mehrfacher Hinsicht von besonderem Interesse erscheinen:

a) Zum Teil treten diese LSD-Symptome bereits nach ähnlich kleinen Dosen wie beim Menschen in Erscheinung.

b) Die verschiedenen LSD-Effekte beim Kaninchen lassen sich zwanglos als Folge eines *zentral ausgelösten sympathikotropen Reizsyndroms* deuten.

c) Ein gesteigerter Erregungszustand sympathischer vegetativer Zentren ist möglicherweise ein wesentlicher Faktor für die Entstehung gewisser psychischer Störungen, wie sie insbesondere auch nach LSD bekannt sind (*cf.* ferner Pervitin- und Amphetamin-«Psychosen», «anxiety»-Reaktionen unter Adrenalineinfluss usw.).

Nachstehend sind die Ergebnisse unserer bisherigen LSD-Untersuchungen an Kaninchen zusammengefasst:

1. *Wirkung auf die Körpertemperatur.* LSD bewirkt eine Erhöhung der Rektaltemperatur, worauf kürzlich auch Horita und Dille[3] hingewiesen haben. Bei quantitativer Untersuchung fanden wir, dass schon 0,5 $\gamma$/kg intravenös bei Kaninchen wirksam sind. Dieser pyretogene Effekt ist dosenabhängig; Steigerung der Dosis führt zu Wirkungszunahme, die schliesslich in tödliche Hyperpyrexie übergeht. Wie mit Hilfe der Kalorimetrie festgestellt werden konnte, ist unter LSD primär die Wärmeabgabe beeinträchtigt, weshalb ein stoffwechselsteigernder Effekt durch freigesetztes Adrenalin als Erklärung wegfällt. Da LSD in den kleinen pyretogen wirksamen Dosen auch keine direkte periphere Gefässwirkung zeigt, muss die Störung im Wärmehaushalt zentral bedingt sein und nervös übermittelt werden. Dementsprechend fehlt am narkotisierten Tier die LSD-Wirkung auf die Körpertemperatur. Auch Vorbehandlung mit hydrierten Mutterkornalkaloiden hemmt bzw. unterdrückt den Temperaturanstieg durch LSD.

2. *Wirkung auf den Blutzucker.* LSD bewirkt an Kaninchen eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels, die mit einer Dosis von 50 $\gamma$/kg subkutan im Durchschnitt etwa 25% und mit 150 $\gamma$/kg subkutan etwa 55% beträgt. Auch dieser zuckermobilisierende Effekt erweist sich als eine zentral ausgelöste Reaktion, da zum Beispiel ein typischer Ganglienblocker wie Hexamethonium die LSD-Hyperglykämie hemmt. Der Effekt einer Adrenalininjektion auf den Blutzucker bleibt hingegen durch Hexamethonium unbeeinflusst. Vorbehandlung mit hydrierten Mutterkornalkaloiden hemmt bzw. verhindert den Blutzuckeranstieg durch LSD ebenfalls.

3. *Mydriatische Wirkung.* LSD hat ebenso wie beim Menschen auch bei verschiedenen Laboratoriumstieren und namentlich beim Kaninchen eine pupillenerweiternde Wirkung. Auch diese LSD-bedingte Mydriase lässt sich durch hydrierte Mutterkornalkaloide hemmen. In Versuchen an der Maus erwiesen sich ausserdem synthetische Sympathikolytika, wie Phentolamin sowie Chlorpromazin in gleicher Weise wirksam.

4. *Weitere Sympathikus-Effekte des LSD.* Die mit LSD behandelten Kaninchen fallen durch starke *Piloerektion* auf, ein allerdings quantitativ nicht genau erfasstes Symptom, das aber ebenfalls auf zentrale Sympathikuserregung hinweist. Das gleiche gilt für die unter dem Einfluss von LSD festgestellte *Pulsbeschleunigung und Erhöhung der Leukozytenzahl.* Die durch LSD bewirkten Veränderungen im *Elektroenzephalogramm* des Kaninchens (Verschwinden der Spindelaktivität und der langsamen Wellen) entsprechen ebenfalls der Auffassung eines fördernden Einflusses von LSD auf aktivierende Systeme.

Dem LSD-bedingten Bild einer zentralen Sympathikuserregung lässt sich das durch Reserpin ausgelöste Syndrom einer zentralen Sympathikus-Hemmung bzw. -Abschirmung mit Überwiegen vagal gesteuerter Funktionen (Temperaturabfall, Sedation, Bradykardie, Miose usw.) gegenüberstellen[4]. Diese beiden Substanzen haben aber nicht nur im vegetativen Bereich, sondern auch in psychischer Hinsicht entgegengesetzte Effekte. Während die LSD-«Psychose» vorwiegend erethische Zeichen mit Anlehnung an den schizophrenen Formenkreis erkennen lässt, wirkt Reserpin nicht so selten depressiv. Ob LSD und Reserpin durch verschiedene Beeinflussung ein und desselben zentralen Mechanismus wirksam werden, ist eine offene Frage. Der zentrale 5-Oxytryptamin (= 5-OT)-Stoffwechsel rückt in diesem Zusammenhang in den Vordergrund. Reserpin bewirkt eine Verminderung des zerebralen 5-OT-Gehaltes[5]. Wie LSD auf den zentralen 5-OT-Stoffwechsel einwirkt, ist bis jetzt unbekannt. Solche Untersuchungen wären aber im Hinblick auf die psychischen LSD-Effekte wahrscheinlich wichtiger als die Befunde über den 5-OT-Antagonismus durch LSD an glattmuskeligen Organen, die auf zentrale Vorgänge nicht übertragen werden können. So hat zum Beispiel, wie schon kurz dargestellt[6], das bromierte LSD (2-Brom-Lysergsäurediäthylamid = BOL 148) wohl eine etwas stärkere 5-OT-antagonistische Wirkung am isolierten Rattenuterus als LSD, jedoch keine psychotische Wirkung am Menschen. Dem Brom-LSD fehlt aber auch die zentrale Erregung des sympathischen Systems, und es kommt selbst in vielfach grösseren als den üblichen LSD-Dosen weder zu Temperatur- noch zu Blutzuckeranstieg.

E. Rothlin, A. Cerletti, H. Konzett,
W. R. Schalch und M. Taeschler

*Pharmakologisches Laboratorium der Sandoz AG., Basel, den 30. Januar 1956.*

*Summary*

d-Lysergic acid diethylamide (LSD 25) produces in rabbits a syndrome consisting of hyperthermia, hyperglycemia, mydriasis, pilomotor activation, cardiac acceleration etc. Analysis of these effects leads to the assumption of an increased sympathetic discharge induced by the central nervous action of LSD 25. Comparison of LSD 25 and reserpine shows opposite characteristics of these two drugs not only in the field of vegetative pharmacology but also concerning influence on psychic functions in man. The possibility should, therefore, be considered that an increased excitatory state of sympathetic centres by LSD 25 is a main factor in the pathogenesis of the well-known psychic disturbances produced by this amide in man.

[2] A. Cerletti, Neuropharmacology II (J. Macy Foundation, 1955), im Druck.

[3] A. Horita und J. M. Dille, Science *120*, 1100 (1954).

[4] H. J. Bein, Exper. *9*, 107 (1953). – J. A. Schneider, Amer. J. Physiol. *181*, 64 (1955).

[5] B. B. Brodie, A. Pletscher und P. A. Shore, Science *122*, 968 (1955).

[6] A. Cerletti und E. Rothlin, Nature *176*, 785 (1955).

## Effect of Heparin Pretreatment on Stress-induced Adrenal Ascorbic Acid Changes in the Rat[1]

It was recently reported that heparin, even in small doses which had no effect on blood coagulation, inhibited the action of the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on circulating eosinophils, blood sugar and blood pyruvic acid in man[2]. Since heparin is an acidic and ACTH a slightly basic substance, the inhibition of the normal responses following ACTH administration was believed to have resulted from its inactivation by the formation of a complex with heparin.

The present investigation was undertaken to determine whether heparin would also interfere with the depletion of adrenal ascorbic acid by endogenous ACTH liberated in response to various stressor agents.

Male white rats weighing from 150 to 250 g were used in the study. They received an initial subcutaneous injection of either 3 mg of the sodium salt of heparin (equivalent to 300 I.U.) or a placebo injection of an equal volume of saline. Two and one-half hours later a second injection containing the stress-producing agent was injected intraperitoneally in all experimental groups except that submitted to cold stress. 90 min after the injection of the stress-producing agent the animals were killed by the intraperitoneal injection of 40 mg pentobarbital sodium.

Blood was obtained by cardiac puncture, the adrenals were excised, and the adrenal ascorbic acid determined by the method of Roe and Kuether[3]. Plasma heparin levels were determined metachromatically by the method of Jaques, Ricker and Bruce-Mitford[4]. The following stress-producing agents at a dose per 100 gm body weight were used: sodium salicylate, 20 mg; epinephrine, 20 $\mu$g; histamine acid phosphate, 1 mg. All volumes were adjusted to 0·2 ml. per 100 g body weight. Animals submitted to cold stress were placed in the cold room at – 2° to – 4° C for exactly 1 h. To evaluate the effect of the experimental procedure, an additional group of rats received only saline injections.

The results are summarized in the Table which shows the mean adrenal ascorbic acid concentrations and plasma heparin levels in animals from the control and experimental groups. The decrease in adrenal ascorbic acid was significant ($P < 0{\cdot}01$) in all groups of animals subjected to stress, whether or not they were pretreated with heparin. The injection of heparin by itself did not produce a significant change in the adrenal ascorbic acid level. There were no significant differences in plasma heparin levels in any group pretreated with heparin, suggesting that stress did not affect the plasma heparin level.

The study demonstrated that the preliminary treatment with heparin did not block the effect of endogenous ACTH on the adrenal cortex. However, it has been reported from this laboratory[5] that the leukocyte response to either endogenous or exogenous ACTH was blocked by the same dose of heparin as that used in this experiment. Since heparin did not prevent the action of ACTH on the adrenal cortex, it must have interfered at a later stage of the stress syndrome, such as the release of the hormones from the adrenal cortex, their transport in the blood or their action at the cellular level. It has been demonstrated that heparin may play a physiological role in fat transport[6] and since the adrenocortical hormones have lipid-like solubility characteristics, it could be possible that heparin is concerned with their transport from the adrenal cortex to the target organ. In the absence of further information, however, it is not possible to define in greater detail the site or mode of action of heparin interference with the responses to stress.

F. R. Morris[7], J. Lowenthal, and L. H. Hamilton

*Departement of Physiology, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada, December 21, 1955.*

[1] This work was supported in part by a grant from the National Research Council of Canada.

[2] L. Weissbecker and A. Schroter, Acta endocrinol. *15*, 66 (1954).

[3] J. H. Roe and C. H. Kuether, J. biol. Chem. *147*, 399 (1943).

[4] L. B. Jaques, I. G. Ricker, and M. Bruce-Mitford, Rev. Canad. Biol. *6*, 740 (1947).

[5] L. H. Hamilton and J. Lowenthal, Endocrinology (in press).

[6] S. W. Levy and R. L. Swank, J. Physiol. *123*, 310 (1954).

[7] Holder of a Lederle Medical Research Fellowship, at the University of Saskatchewan, College of Medicine, from June 1 to August 31, 1954.

Effect of heparin pretreatment on the depletion of the adrenal ascorbic acid by different stress-producing agents

| Treatment | Number of animals | Adrenal ascorbic acid concentration mg/100 g Mean ± S. E. | Percent decrease from control | Plasma heparin level, units/ml Mean ± S. E. |
|---|---|---|---|---|
| Saline saline | 9 | 449·7 ± 23·1 | | |
| Heparin saline | 7 | 462·6 ± 24·6 | | 1·53 ± 0·25 |
| P value for difference* | | > 0·5 | | |
| Saline salicylate | 5 | 313·6 ± 22·4 | 30** | |
| Heparin salicylate | 5 | 317·8 ± 25·3 | 29** | 1·29 ± 0·20 |
| P value for difference | | > 0·5 | | |
| Saline epinephrine | 6 | 285·8 ± 23·8 | 36** | |
| Heparin epinephrine | 5 | 248·1 ± 34·0 | 45** | 1·37 ± 0·17 |
| P value for difference | | > 0·3 | | |
| Saline histamine | 5 | 261·5 ± 27·3 | 42** | |
| Heparin histamine | 5 | 267·8 ± 19·3 | 41** | 1·35 ± 0·23 |
| P value for difference | | > 0·5 | | |
| Saline cold | 5 | 305·9 ± 10·5 | 32** | |
| Heparin cold | 5 | 286·9 ± 25·2 | 37** | 1·35 ± 0·21 |
| P value for difference | | > 0·5 | | |

* P value greater than 0·05 not considered significant. ** Decrease from control highly significant, P value less than 0·01.

*Zusammenfassung*

Vorbehandlung mit Heparin hat keinen Einfluss auf die Verminderung der Ascorbinsäure der Nebennierenrinde nach Verabfolgung von Natriumsalicylat, Epinephrin, Histamin und Kälteeinwirkung.

## DISPUTANDUM

### Zur Entstehung der Magensalzsäure über einen «Precursor»

Bisher war man der Ansicht, dass die Salzsäure erst in einer inaktiven Form in der Schleimhaut des Magens entsteht, als eine Abhandlung von BRADFORD und DAVIES[1] erschien, die auf Grund von drei brauchbaren Indikatorergebnissen das Gegenteil beweisen will. In dieser Arbeit haben beide Autoren überzeugend nachgewiesen, dass in der Parietalzelle der sezernierenden Schleimhaut des Magens vom Frosch und auch anderer Tiere die pericanaliculären Partien des Zytoplasmas ein stark saures Milieu mit einem pH $< 1{,}4$ aufweisen.

Sie folgern daraus, dass die Salzsäure nicht erst an der Oberfläche der Schleimhaut entsteht – nachdem sich in der Parietalzelle der Schleimhaut ein «Precursor», eine inaktive Form der Salzsäure, gebildet hat – sondern direkt in der Parietalzelle in der Tiefe der Schleimhaut.

Bevor wir zu dieser *Deutung* Stellung nehmen, sei kurz die besondere Technik wiedergegeben, deren sich die Verfasser bedient haben: Die frisch entnommenen Froschmägen werden zurechtgestutzt; an beiden Enden zugebunden, kommen sie in eine entsprechende wässrige Nährlösung, die mit einem Gemisch von 5% Kohlensäure und 95% Sauerstoff beatmet wird. In diese Lösung wird der Indikator und Histamin gegeben. Das besondere an dieser Färbweise liegt darin, dass die Lösung von der nutritiven Seite des noch tätigen Magens her, fast wie im Leben, zur Einwirkung kommt.

Die drei brauchbaren Indikatoren sind Neutralrot, Acridin und Aminoazotoluol (AAT).

Der erste Farbstoff, der als «quaternary ammonium salt» gut in Wasser löslich ist, ist schon bei einem pH $<$ 6,8 rot (KOLTHOFF 1932), was über die Azidität in der Parietalzelle nicht viel aussagt.

Der zweite Stoff Acridin ist bekanntlich eine farblose Verbindung, die bei einem pH $< 4{,}85$ im ultravioletten Licht grün und bei einem pH $> 4{,}85$ blassblau fluoresziert. Da die mit Blut gefüllten Gefässe im ultravioletten Licht auch grünlich erscheinen, so sprechen sich die Autoren in dem Sinne aus, dass das mikroskopische Bild nur mit der grössten Sorgfalt interpretiert werden darf; doch kommen sie bei Innehaltung aller Vorsichtsmassnahmen zur Annahme, dass das pH $< 4{,}85$ sein muss.

Der für die Autoren schlagende Beweis wird mit AAT geliefert, welches bei einem pH $< 1{,}4$ rot und $> 2{,}8$ gelb ist. Den beiden letztgenannten «öllöslichen» Indikatoren werden die wässrigen Partien der Magenschleimhaut dadurch zugänglicher gemacht, dass sie vorher aus salzsaurer Lösung durch rasche Neutralisation in Form von Mikrokristallen gefällt werden. Die Autoren sprechen davon, dass Mikrokristalle durch ihre grössere Oberflächenaktivität löslicher als gröbere Kristalle sein dürften, was unseres Erachtens nicht zutreffen kann; wohl aber können sie sich rascher lösen. Um eine kolloidale Lösung handelt es sich hier nicht.

Im Gegensatz zu BRADFORD und DAVIES ist für uns die von diesen Autoren nachgewiesene Rotfärbung der Partien um die Canaliculi und Sekretgänge des Zytoplasmas mit AAT und die grüne Fluoreszenz mit Acridin *kein Beweis* dafür, dass im Gewebe freie Salzsäure vorhanden war; letztere kann nämlich, gebunden in einem Precursor, vorhanden gewesen sein, aus dem während der Färbung unter Mitwirkung des Indikators freie Salzsäure sekundär gebildet und freigesetzt wird.

Unter einem Precursor verstehen wir ein salzsaures Salz, das durch eine Schutzvorrichtung daran gehindert wird, freie Salzsäure zu bilden.

So wäre zum Beispiel Betainhydrochlorid (Acidol) dann als ein Precursor der Salzsäure anzusehen, wenn es durch entsprechende Abschirmung vor Wasser geschützt ist.

Ein HCl enthaltendes Protein oder ein amphoteres bzw. betainartiges Gebilde im wässrigen Medium der Schleimhaut ist also *erst dann* ein Precursor der Magensalzsäure, wenn es in einem nicht ionogenen *öligen* Medium gelöst ist, wo es den Einflüssen der wässrigen Gewebsflüssigkeit entzogen ist, wie wir kürzlich dargelegt haben[2].

Als Bausteine eines derartigen physiologischen Precursors, der die erwähnten Eigenschaften aufweist, kommen allein die öllöslichen Phosphatide und (nach BERSIN[3]) die Acetalphosphatide der sogenannten Lipoid-Lipide in Betracht, sofern sie eine betainartige Gruppe wie die Cholinphosphorsäure besitzen. In Verbindung mit HCl entsteht dann daraus der Precursor. Ein bevorzugter Vertreter dieser Gruppe ist das Lecithin, das in Verbindung mit HCl, in Öl gelöst, den gesuchten physiologischen Precursor abgibt.

Wie kommt es nun, dass gerade mit den beiden öllöslichen Indikatoren Acridin und AAT in dem pericanaliculären Teil des Zytoplasmas das Milieu freier Salzsäure nachgewiesen wurde?

Die Base AAT ist in Wasser sehr wenig (wir fanden nur 5 $\gamma$/cm$^3$), aber in Öl sehr leicht löslich; ihr Hydrochlorid ist dagegen nicht mehr fett-, sondern wasserlöslich. Im Gegensatz dazu bleibt Lecithin infolge seiner langen Fettketten auch als Hydrochlorid öllöslich.

Kommt nun die in Wasser suspendierte Base AAT in Berührung mit den Lipoid-Lipiden der Parietalzelle in der sezernierenden Schleimhaut des Magens, in denen HCl, an Lecithin gebunden, als Precursor im Öl vorkommt, so wird die Farbstoffbase in das bessere Lösungsmittel (Fett) gehen. In den Fettstoffen gelöst, wird dann die Farbstoffbase das HCl des Lecithinhydrochlorids binden, weil sie eine stärkere Base als Lecithin ist. Es entsteht das nicht mehr öllösliche AAT-hydrochlorid, welches wasseraffin ist. Letzteres geht in die Wasserphase, wo es durch teilweise Hydrolyse in die Base AAT und Salzsäure gespalten wird. Die Base löst sich von neuem in der Fettphase, wobei sich der Prozess solange wiederholt, bis die Konzentration der Salzsäure in der Wasserphase so gross ist, dass das Farbstoffsalz beständig bleibt und nicht weiter hydrolysiert, also bei einem pH $< 1{,}4$. Damit ist es zur Rotfärbung gekommen.

Diese Schritte lassen sich in Modellversuchen nachweisen.

Auch Acridin ist in Wasser fast unlöslich und in Fettstoffen löslich, während es sich mit seinem salzsauren Salz ebenso verhält wie beim AAT. Acridin ist eine schwache Base, die immerhin Lackmuspapier noch blau

[1] N. M. BRADFORD und R. E. DAVIES, Biochem. J. *46*, 414 (1950).

[2] E. SOLMS und J. BRAS, Z. Biol. *107*, 321 (1954).

[3] Briefliche Mitteilung.

färbt; sie löst sich in der Fettphase der Parietalzelle und entzieht das HCl dem Lecithinhydrochlorid. Das Hydrochlorid des Acridins ist dann als Salz wasserlöslich und geht in die Wasserphase über, in der es im Ultraviolettlicht grün fluoresziert.

Schliesslich sei darauf hingewiesen, dass auch die Richtung des elektrischen Oberflächenpotentials darauf hindeutet, dass keine freie Salzsäure in der Tiefe der sezernierenden Schleimhaut des Magens vorhanden ist[4].

Ähnlich verhält es sich mit der negativ verlaufenden Cl'-Reaktion nach Lison[5] und anderen; es wurden keine freien Chlorionen im wässrigen Zytoplasma der Parietalzelle nachgewiesen.

Der Befund, den Bradford und Davies bei ihren Indikatorproben einwandfrei erhalten haben, deutet also im Verein mit den anderen Untersuchungsresultaten darauf hin, dass nicht im Zytoplasma freie Salzsäure, sondern in den Lipoid-Lipiden der Parietalzelle ein Precursor, das Lecithinhydrochlorid, vorkommt. Die um die pericanaliculären Partien des Zytoplasmas der Parietalzelle nachgewiesene freie Salzsäure dürfte ein Artefakt sein, gebildet durch Wechselwirkung der Indikatoren (AAT bzw. Acridin) mit dem physiologischen Precursor im diphasischen System der Magenschleimhaut. – Damit kommt es zum Ausgleich aller bisher sich widersprechenden Untersuchungsbefunde.

Es darf nicht übersehen werden, dass das Leben der Zelle gefährdet ist, wenn freie Salzsäure im Zytoplasma der Parietalzelle entsteht. Die Eiweisskörper des Zytoplasmas kommen als Proteinate vor; es sind Anionen, die in der Hauptsache an Kalium gebunden sind. Sollte nun der nach Bradford und Davies physiologische, nach unserer Meinung patho-physiologische Fall eintreten, dass in irgend einer Weise im Zytoplasma Salzsäure entsteht, so wird letztere sofort mit dem Kalium des Eiweisskörpers reagieren, wobei zunächst isoelektrisches Protein entsteht, das zur Präzipitation kommt. Beim Weitergehen des Prozesses bildet sich aus dem koagulierten Eiweiss Proteinhydrochlorid, in dem das Protein in umgekehrter Weise nun als Kation fungiert. Es dürfte klar sein, dass keine Zelle einen derartigen Eingriff überleben wird.

Dieser Hinweis erscheint uns wichtig, da die Deutung von Bradford und Davies zunehmende Beachtung findet[6].

E. Solms und J. Bras

*Aus den Laboratorien Vondelingenplaat, Rotterdam, den 30. November 1955.*

*Summary*

Bradford and Davies did not succeed in demonstrating with their indicator-experiments that free hydrochloric acid is formed without a precursor in the oxyntic cells of the gastric mucosa. The free hydrochloric acid, as shown by them, is formed as an artefact owing to the action of the indicator.

[4] Siehe H. Rein, *Einführung in die Physiologie des Menschen* (Springer-Verlag Berlin 1941), S. 205.

[5] Siehe B. Romeis, *Mikroskopische Technik* (Leibniz-Verlag, München 1948), § 2064.

[6] Siehe H. Rein und M. Schneider, *Einführung in die Physiologie des Menschen* (Springer-Verlag Berlin 1955). – B. Flaschenträger und E. Lehnartz, *Physiologische Chemie* (Springer-Verlag Berlin 1954).

PRO LABORATORIO

## Investigation of the Circulation with Fluorescent Substances

*A New Technique*

Fluorescent substances have been used in the investigation of the circulation by Schlegel[1], Algire *et al.*[2], Moses *et al.*[3]. They employed Thioflavine-S (methyl dehydrotio-p-toluidine-sulphonate) or a polymer of it (Vasoflavine). The vessels were examined either *in vivo* (Algire *et al.*[2]) *or post mortem* (freezedried specimens: Schlegel *et al.*[1], or prepared in glycerin: Moses *et al.*[4], Schlegel and Moses[5]).

Fig. 1. – Kidney from a rabbit weighing 1 kg. The animal had received 80 mg Vasoflavine 20 s before it was killed. The glomeruli and the vessels in the medulla are readily recognized. Photographic plate: Gevaert superchrome 32°. Enlargement × 5.

In the investigation of intra-osseous circulation (Brodin[6]) the above mentioned methods were found unsuitable, and a new technique was devised.

*Method and Material.* The fluorescent substance is injected intravenously into the experimental animal (rabbit), which is killed about 20 s afterwards. The or-

[1] J. U. Schlegel, Anat. Rec. *105*, 433 (1949).

[2] G. H. Algire and J. U. Schlegel, J. cell. comp. Physiol. *35*, 95 (1950).

[3] J. B. Moses and J. U. Schlegel, Anat. Rec. *114*, 149 (1952).

[4] J. B. Moses, A. J. Emery, and J. U. Schlegel, Proc. Soc. exper. Biol. med. *77*, 233 (1951). – J. B. Moses and J. U. Schlegel, Anat. Rec. *114*, 149 (1952).

[5] J. U. Schlegel and J. B. Moses, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *74*, 832 (1950).

[6] H. Brodin, Acta orthop. Scand. [Suppl.] *20*, (1955).

gans to be studied are removed without delay and placed in a freezing mixture with a temperature of about — 80° C (96% alcohol + carbon dioxide ice in an isolated vessel). The organs are then taken out of the mixture in the cold room (temp. — 10° C to — 15° C) and wiped off, after which they are planed to desired depth. The smooth, planed surface, which is shiny, is photographed with the use of a suitable filter in ultraviolet light.

*Examples*

(1) *Parenchymatous tissue* (rabbit's kidney). Use was made of Vasoflavine (Gurr, England), which persists a fairly long time in the blood vessels (Fig. 1).

(2) *Partly fibrous tissue* (rabbit's eye). Vasoflavine (Fig. 2).

(3) *Hard and soft tissue* (lower leg of rabbit). Sodium 3-oxypyrene-5, 8, 10-trisulphonate (Bayer, Germany). The substance is acidic and shows a strong affinity for bone tissue. It readily diffuses out through the blood vessels (Fig. 3).

*Comments.* The method described appears to be useful in the investigation of the circulation in both hard and soft tissue. It is simple and quicker than the deep freezing method. Freezing of the isolated organs to be studied prevents the diffusion of the fluorescent substance, an advantage not offered by the preparation of the parts in glycerin. However, the method has some disadvantages: if the specimen contains bone tissue, the blade of the plane will soon become blunt, and if the cold room is small and the relative humidity therefore high, there is a risk of ice crystal formation on the surface of the specimen.

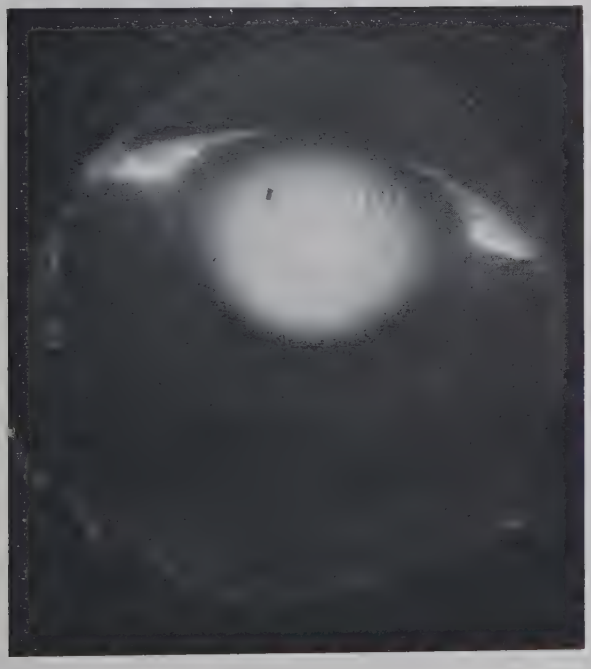


Fig. 2. — Eye of the same rabbit as in Figure 1. The fluorescence of the lens is auto-fluorescence. It appears to be more pronounced in the central part of the lens. Vasoflavine fluorescence is seen in the ciliary body and, though faintly, in the chorioid. No fluorescence is seen in the anterior or posterior chamber. Photographic plate: Gevaert superchrome 32°. Enlargement × 4.

The fluorescent substance should preferably be non-toxic, it should not permeate the vessel wall, it should be homogeneous and not coagulant. Vasoflavine is labile

Fig. 3. — Proximal part of a tibia of a rabbit weighing 1 kg. The animal had received 100 mg of sodium-3-oxypyrene-5, 8, 10-trisulphonate intravenously 20 s before it was killed. Fluorescence is seen in and around some muscle arteries, in and adjacent the epiphyseal cartilage, and in the endosteal and periosteal surface of the bone. Photographic plate: Gevaert superchrome 32°. Enlargement × 3.

and slightly coagulant. Oxypyrene (like fluorescein) readily permeates the vessel wall.

The method described was used in the investigation of the blood flow to the metaphyseal region of the tibia of the rabbit (Brodin[6]) and of the nutrition of cartilage (Brodin[7]). It is probably also useful in the experimental study of transplants (bone, vessel, skin), fractures, circulatory disturbances and, with a substance capable of permeating the vessel wall, possibly also for the investigation of the circulation of the aqueous humour.

H. Brodin

*Orthopaedic Clinic, University of Lund, January 2, 1956.*

*Zusammenfassung*

Es wird eine neuartige Methode zum Studium der Blutzirkulation in derbem und weichem Gewebe beschrieben. Ein fluoreszierender Stoff wurde intravenös injiziert, das Präparat tiefgefroren, mit einem Hobel geglättet und dann photographiert.

7 H. Brodin, Acta orthop. Scand. *24*, 177 (1955).

PRO EXPERIMENTIS

## A Microscopic Film of the Movements of Bull Sperm Cells in Dark-field Illumination

In the course of an investigation of the movements of bull spermatozoa, it became desirable to make films of sperm samples. Since the results yielded by these films had to be coordinated with other measurements taken simultaneously on the same samples, working with dark-field illumination could not be avoided.

In brief, the films were further required to give:

(1) Inter-frame-time $< {}^1/_{40}$ s; 50 frames per s were chosen, because of the convenience of synchronisation with the mains.

(2) Exposure time less than 1 ms.

(3) Magnification, taken from sample to emulsion, $\times$ 25 at least, in order not to be limited in resolving power by the grain of the emulsion.

(4) Total length of one film at least 30 s.

We decided to work with a low numerical aperture, which gives the advantage of great depth of focus.

The difficulty is to obtain proper illumination of the samples. From some experiments made with a small-aperture dark-field condenser (a single lens, the central part of which had been diaphragmed) and a incandescent lamp, it appeared that an energy of about 10 Ws per frame would be needed. The construction of a point-shaped light source capable of producing this 50 times per second is extremely difficult.

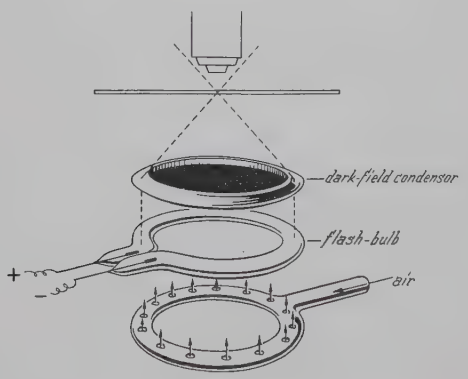



Abb. 1.

Obviously it is advantageous to use light sources with larger dimensions. We decided to use a ring-shaped electronic flash; the ring has the same dimensions as the opening of the condenser (see Fig. 1). This optical arrangement is in first approximation independent of the distance lamp condenser which implies that the adjustment is not at all critical, whilst at the same time, geometrically, a very satisfactory useful effect of light is obtained.

At our request NV Philips Eindhoven developed a suitable flash-bulb, made of quartz and air-cooled. The shape of the lamp makes it easy to do this latter very effectively.

The electrical circuit of the lamp is very simple: a single phase rectifier charges a capacitor battery of 15 $\mu$F in about ${}^1/_4$ of a period of the mains. In the following negative half period the bulb is triggered by a thyatron with a tesla coil. By putting a resistor in series with the capacitors, the peak voltages on the latter may be varied from 800 to 1800 V, giving an energy of 5 to 25 Ws.

At a power input of 0·3 kW, the lamp may be used for many hours continuously; at the maximum input of 1·3 kW, this is reduced to several minutes. Sufficient data as to life are not yet available. The flash-time was measured to be 100–250 $\mu$s, dependent on the energy used.

Abb. 2.

Some more details about the equipment:

(1) The image of the objective ($\times$ 10, A = 0·25) is magnified $\times$ 2·5 with a small (corrected) lens.

(2) A Kodak gun-camera, in this case driven by a 40 W synchronous motor.

(3) Emulsion: Kodak Tri-X, developed with high contrast developer.

Some films of sperm-samples have been made with this equipment. Figure 2 shows a number of frames taken at an energy of 15 Ws. The object in mind, namely the determination of the manner of movement of sperm cells, can obviously be achieved in this way.

In conclusion, we may say that the making of a microscopic moving picture in dark-field illumination has been realised with relatively simple means. The illumination employed seems to be quite suitable for phase-contrast microscopy also (where the quantity of light desired is much lower), by focussing the lamp on the ring-shaped opening of the condensers.

A more detailed description of the apparatus will be published later on.

R. Rikmenspoel and G. van Herpen

*Research Institute for Animal Husbandry T.N.O., Utrecht, October 15, 1955.*

*Zusammenfassung*

Eine Anordnung zur kinematographischen Aufnahme von Spermien von Musterbullen in Dunkelfeldbeleuchtung wird beschrieben. Die Bildfolge von 50 Aufnahmen je Sekunde erfordert eine Lichtquelle von etwa 0,8 kW, welche von einer Spezial-Elektronenblitzlampe geliefert wird.

## PRO EXPERIMENTIS

### A Method for the Isolation of the Parts of Ciliates[1]

Methods have been devised in this laboratory for isolating quantities of the parts of the infraciliature of *Tetrahymena*, in order that the structure and biochemistry of the ciliary apparatus may be studied. In view of the interest shown by some workers, it has been thought advisable to indicate something of the nature of the method, the kind of results obtainable, and the possibilities of using the method for physiological and morphological analysis of the parts of ciliates.

The method now in use is an adaptation of the method originated by Mazia and Dan[2] and modified by Mazia[3] for the isolation of the mitotic apparatus of dividing sea urchin eggs. In general, it consists of killing the cells by immersion in aqueous-ethanol at sub-zero temperatures, and subsequently transferring them to an aqueous solution of digitonin. The digitonin solution solubilizes much of the cytoplasm of the cell, releasing the nonsolubilized components of the cell so that they are found free in the medium, whereupon they can be collected by differential centrifugation. In the present work, the ciliate *Tetrahymena pyriformis* strain *W* has been grown axenically in 2% proteose-peptone. The cells are concentrated by centrifugation and washed three times with distilled water. The cells are then suspended in 40% ethanol at $-10°$C, and stored at $-10°$ for a few hours. The alcohol suspension is then centrifuged at $-10°$ to collect the cells, the alcohol is decanted, and the sedimented cells are suspended in a 1% aqueous solution of digitonin. The alcohol treatment must never take place above 0°C or the cytoplasm will coagulate and be rendered resistant to the solubilizing action of the digitonin. The solubilization of the cells in digitonin can be followed by observation with phase contrast microscopy.

It has been observed that, when the digitonin suspension is salt-free, all the components of the cell are disrupted and solubilize except the cilia, the kinetosomes, and certain other fibrous structures. The endoplasm, pellicle, and nucleus are dispersed. The kinetosomes forming the membranelles around the mouth are held intact by connecting fibers, and can be isolated *en masse* along with the attached gullet fibers. The somatic kinetosomes (those not in the oral apparatus) do not hold together, except in the anterior polar region where cross-connecting fibers appear to be present. With the dissolution of the pellicle, the cilia are detached from their respective basal granules and float free. Figure 1 is a high-power phase contrast photomicrograph of such a preparation that has been allowed to solubilize under a coverslip so that the kinetosomes retain their natural positions.

Fig. 1.–Phase contrast photomicrograph of a "solubilized" *Tetrahymena*, showing the kinetosomes and oral apparatus. × 2000.

The structure and arrangement of the infraciliature, especially the associations of kinetosomes and fibers of the oral apparatus, can be seen in such "solubilized" preparations under phase contrast microscopy with a clarity which is approached only by the more tedious methods of silver staining and the "sonicated" preparations used by Metz and coworkers[4]. In addition, these latter methods render the material itself unsuitable for biochemical investigation. Preparations of other protozoa, by the alcohol-digitonin method, have yielded material of further interest. The hypermastigote flagellate *Trichonympha*, obtained from the gut of the termite *Zootermopsis*, has given strikingly clear preparations of isolated anterior ectoplasmic cones with the flagella attached. Pitelka has used this method to produce preparations of opalinid ciliates which have been favorable for electron microscopy and will be described in a later publication.

The dissolution of such structures as the nucleus, pellicle, and mitochondria can be prevented by carefully using a digitonin-KCl solution for solubilization. The nucleus can be prevented from being solubilized if the digitonin solution contains some salt, up to 0·05 *M* KCl.

[1] This investigation was supported by the American Cancer Society, recommended by the Committee on Growth, National Research Council.

[2] D. Mazia and K. Dan, Proc. nat. Acad. Sci. *38*, 826 (1952).

[3] D. Mazia in: *Symposium of the Society for Experimental Biology 9*, 335 (1955).

[4] C. B. Metz, D. R. Pitelka, and J. A. Westfall, Biol. Bull. *104*, 408 (1953). – C. B. Metz and J. A. Westfall, Biol. Bull. *107*, 106 (1954).

Fig. 2.–A low power electron micrograph of a field of cilia isolated by the alcohol-digitonin method.

Under these conditions, all parts of the cell are less susceptible to digitonin solubilization, but preparations have been obtained which contained many freed nuclei. With higher salt concentrations in the digitonin solution, 0·1 to 0·3 *M* with respect to KCl, all parts of the cell are resistant to digitonin solubilization. At 0·4 *M* KCl, most of the cilia and nuclei disappear, the cytoplasm becomes somewhat clearer, and what appear to be mitochondria located beneath the pellicle in the spaces between kineties, are present. At 0·5 *M* KCl, the cilia, nucleus and most of the cytoplasm dissolve, leaving the refractive pellicle with only faint traces of what look like kinetosomes.

The preparation of mass isolations of the parts of the cell, which have been freed by this procedure of "selective solubilization", is subject only to the usual difficulties attending differential centrifugation. A field of isolated cilia, pictured by low-power electron microscopy, is shown in Figure 2. Kinetosome isolation has been found to be more difficult, largely because of the lack of any criteria for distinguishing them from other small round bodies. Methods are being developed, however, for isolating large quantities of kinetosomes of the oral membranelles since these can be initially isolated as part of the intact oral apparatus. The isolation of nuclei and pellicles, to mention only two of the many fibrous structures found in ciliates, should provide valuable material for biochemical analysis.

F. M. Child and D. Mazia

*Department of Zoology, University of California, Berkeley, February 10, 1956.*

*Zusammenfassung*

Eine Methode für selektive Solubilisierung der Zellen und verschiedener Organellen von Ciliaten, welche auf einer speziellen Anwendung der Methode Mazia und Dan zur Gewinnung isolierter Mitoseapparate von Seeigeleiern beruht, wird beschrieben. Die Ciliaten werden bei niedriger Temperatur in 40% Ethanol extrahiert und mit Digitonin behandelt. In salzfreier Digitoninlösung (1% aq) bleiben nur das Wimpernsystem und damit verbundene Strukturen erhalten und können in genügender Menge für chemische Analysen gewonnen werden. Durch Zugabe verschiedener Mengen von KCl ist es möglich, auch Zellkerne, Pellicula, usw. vor der Auflösung zu schützen und durch differentielle Zentrifugierung zu isolieren.

# Informations - Informationen - Informazioni - Notes

## STUDIORUM PROGRESSUS

### La question des hétérochromosomes chez les Sauropsidés. Oiseaux.

Par J. M. van Brink et G. A. Ubbels[1], Utrecht

Si le type d'hérédité liée au sexe a été précisé chez les Oiseaux depuis plus de 40 années, la reconnaissance cytologique de la digamétie femelle qu'implique ce type demeure un problème toujours discuté, les travaux parus avant 1949 ayant fait l'objet d'une critique serrée de Matthey[2]. Le désaccord qui se manifeste chez les divers auteurs provient en premier lieu de difficultés techniques: les chromosomes sont toujours très nombreux et en majorité de très petite taille (inférieure à 0,5 $\mu$); un tel matériel exige une fixation impeccable en dépit de laquelle l'observation reste très difficile.

L'espèce la plus étudiée est le Poulet, et ce sont les cytologistes japonais (Suzuki, Oguma et surtout Yamashina[3]) qui ont fait les recherches les plus approfondies sur ce matériel. Ces trois auteurs ont trouvé un nombre de 78 chromosomes chez le mâle, de 77 chez la femelle. La cinquième paire, formée de petits métacentriques, serait représentée par un seul élément dans le sexe femelle.

A en juger d'après les figures publiées, la technique de l'école japonaise (fixations aux liquides de Hermann et de Champy) est infiniment supérieure à toute autre. Malgré cela, les conclusions de Yamashina ne peuvent, selon Matthey, être acceptées sans réserves: pour cet auteur le décompte objectif de 78 éléments, dont un bon nombre est à la limite de la visibilité, est une chose impossible, ce qui élimine d'emblée tout argument d'ordre numérique en ce qui concerne la question des hétérochromosomes. D'autre part, l'analyse morphologique est très délicate et les possibilités d'erreur nombreuses: la différence entre acrocentriques et métacentriques de taille moyenne ou petite est, dans beaucoup de cas, difficile à apprécier, ce qui rend l'appariement, et par conséquent la découverte d'une paire d'hétérochromosomes très douteux.

Newcomer et Brant[4] ont étudié la spermatogénèse sur des frottis fixés par un mélange complexe à base d'acide propionique et arrivent aux conclusions suivantes: le nombre de chromosomes n'est pas constant

[1] Institut de Génétique de l'Université, Utrecht.

[2] R. Matthey, *Les chromosomes des Vertébrés* (F. Rouge, Lausanne 1949).

[3] Y. Yamashina, Cytologia *13*, 270 (1944).

[4] E. H. Newcomer et J. W. A. Brant, J. Heredity *45*, 79 (1954).

et beaucoup moins élevé que ne le croit YAMASHINA. La source des anomalies numériques serait le comportement aberrant des microchromosomes, qui se formeraient au cours de la prophase à partir des segments hétérochromatiques des macrochromosomes; ces microchromosomes auraient un centromère diffus et se multiplieraient par simple fragmentation. A la fin d'une division ils seraient de nouveau résorbés par les grands éléments. Les hétérochromosomes seraient représentés par la première paire, hypothèse fondée sur des raisons génétiques et cytologiquement d'autant moins admissible que la femelle n'a pas été étudiée.

Nous avons repris l'étude des chromosomes du Poulet[5] en utilisant la technique décrite par MAKINO et NISHIMURA[6], dont les Japonais eux-mêmes n'ont jamais fait usage mais qui, dans la modification de MATTHEY a donné d'excellents résultats chez les Mammifères (MATTHEY[7]) et les Reptiles (MATTHEY et VAN BRINK[8]).

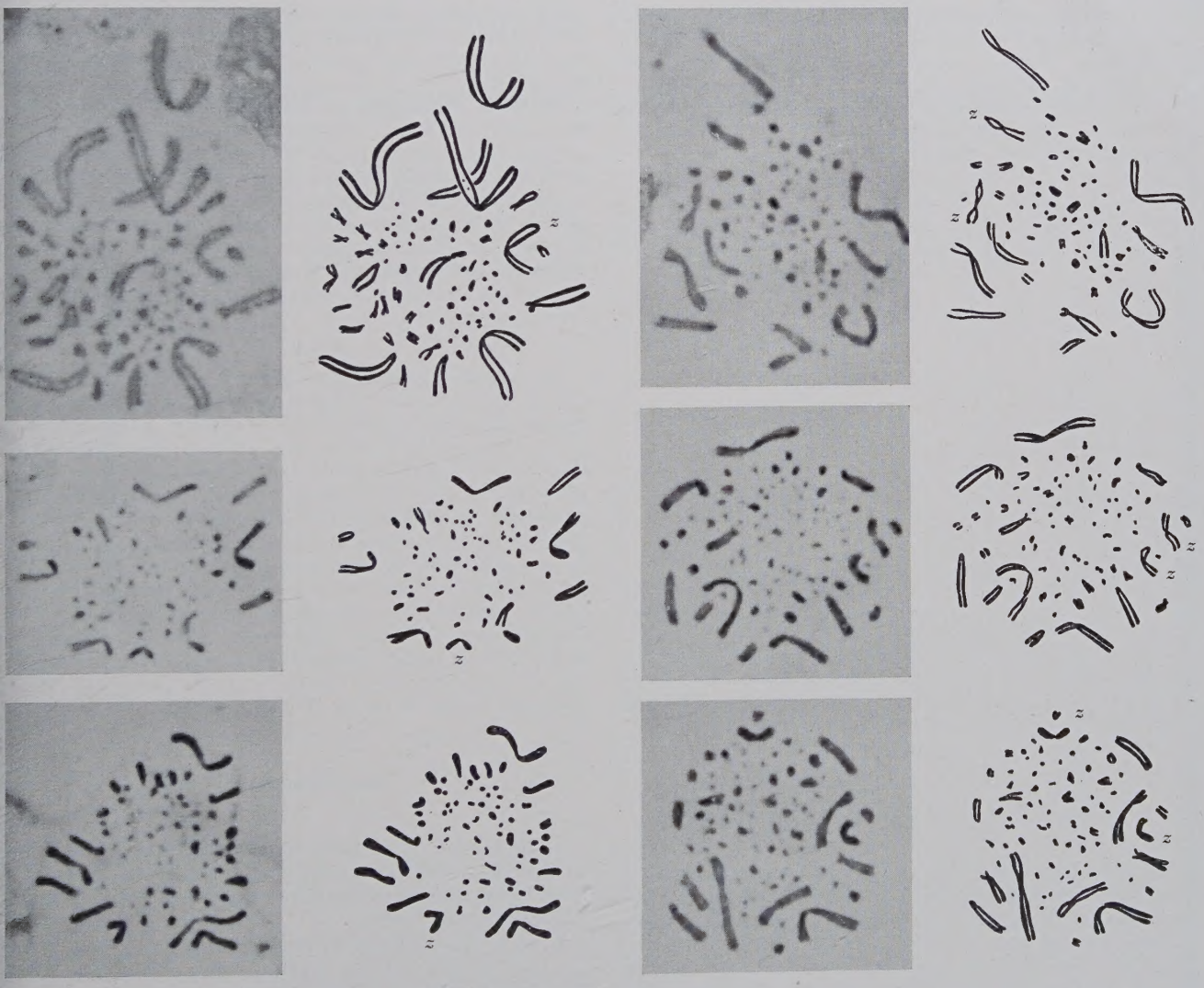
[5] Nous remercions vivement M. P. UBBELS, Directeur de l'Institut gouvernemental d'Aviculture, Beekbergen, Hollande, qui a mis aimablement à notre disposition un abondant matériel.

[6] S. MAKINO et I. NISHIMURA, Stain Techn. *27*, 1 (1952).

[7] R. MATTHEY, Rev. Suisse Zool. *60*, 225 (1953).

[8] R. MATTHEY et J. M. VAN BRINK, Exper. (sous presse).

*Résultats:* A. *Nombre de chromosomes.* De nombreuses mitoses de très bonne qualité – tous les éléments étant bien étalés et sans aucune superposition – ont été trouvées dans les gonades ainsi que dans la rate d'embryons de 10 à 13 jours. Les métaphases montrent l'image typique pour les Oiseaux: une couronne de grands éléments entoure un grand nombre d'éléments de taille extrêmement petite. Cependant la présence de chromosomes de dimensions intermédiaires rend la distinction des deux catégories plutôt imprécise. Dans les prométaphases, où les chromosomes sont encore peu contractés, la transition entre macros et micros est déplacée vers les petits éléments, et l'on trouve jusqu'à 10 ou 11 paires de chromosomes non-punctiformes (Fig. 1 et 4), tandis que dans les métaphases proprement dites la septième ou même la sixième paire est la dernière qui puisse être attribuée à la catégorie des macrochromosomes. Si les microchromosomes subissent une contraction comparable à celle des grands – ce qui semble ne pas être exclu (Fig. 1 et 3) – beaucoup d'entre eux, qui, à la prophase, sont déjà à la limite de la visibilité, pourraient peut-être à la fin de la métaphase avoir passé au delà de cette limite; en outre le «blocage» est toujours difficile à dépister lorsqu'il s'agit de chromosomes très petits.




1—3. 1*a*—3*a*.

*Gallus domesticus.* Fig. 1–3 et 1*a*–3*a*. Mitoses chez la ♀.

4—6. 4*a*—6*a*.

Fig. 4–6 et 4*a*–6*a*. Mitoses chez le ♂. × 1950.

Ceci ne signifie pas qu'il y ait «coalescence» ou «résorption des petits par les grands», supposition avancée par Newcomer et Brant à propos de phénomènes analogues qui se produiraient à la fin de l'anaphase I, et qu'ils disent avoir également observés dans des divisions somatiques. Mais nous voyons que des exceptions apparentes à la loi de la constance numérique pourraient trouver leur cause dans la contraction des éléments les plus petits qui cessent, en passant de la prométaphase à la métaphase, d'être encore visibles. Inversément, la fissuration très marquée des grands chromosomes prométaphasiques se manifeste vraisemblablement chez les microchromosomes aussi, ce qui peut conduire l'observateur à compter deux éléments là où il y a deux chromatides. Dans ces conditions la nature «accessoire» qu'attribuent les auteurs américains aux microchromosomes ne nous paraît pas du tout prouvée par leurs observations sur la prophase méiotique (stade difficile à fixer et défavorable pour la numération). D'ailleurs, les photographies même de Newcomer et Brant ne justifient en rien la thèse de ces auteurs: en particulier la métaphase I de leur figure 20 *K* montre clairement 35–40 bivalents et n'illustre nullement une prétendue fragmentation. Quant à l'argument génétique de six groupes de linkage, correspondant à un maximum de six paires de chromosomes génétiquement actifs, il est contredit par les auteurs eux-mêmes qui signalent l'existence de gènes se ségrégeant indépendemment des six groupes principaux.

Le tableau suivant montre les nombres de chromosomes que nous avons trouvés dans une trentaine de cinèses sévèrement sélectionnées:

| Nombre de chromosomes | Nombre de cinèses ♀ | Nombre de cinèses ♂ |
|---|---|---|
| 67 | 1 | – |
| 68 | – | 2 |
| 69 | – | 1 |
| 70 | – | 1 |
| 71 | – | – |
| 72 | 1 | 1 |
| 73 | 2 | – |
| 74 | 2 | – |
| 75 | 2 | – |
| 76 | – | 1 |
| 77 | 2 | 4 |
| 78 | 1 | 2 |
| 79 | 1 | – |
| 80 | 1 | 1 |
| 81 | – | 1 |
| 82 | 2 | – |

Si, parmi ces cinèses on choisit comme les plus représentatives celles qui donnent l'impression d'une fixation tout particulièrement réussie, la variabilité devient plus petite, mais ne disparaît pas tout à fait:

| | | |
|---|---|---|
| 75 | 2 (Fig. 1 et 2) | – |
| 76 | – | – |
| 77 | – | 1 (Fig. 6) |
| 78 | – | 1 (Fig. 5) |
| 79 | 1 | – |

A notre avis toutes les variations numériques trouvées s'expliquent d'une manière satisfaisante si on admet que les microchromosomes ne diffèrent des macrochromosomes que par leur dimensions, et que, mise à part cette différence inexpliquée, leur comportement est comparable à celui des macrochromosomes. Une hypothèse aussi révolutionnaire que celle de Newcomer et Brant est inutile: la courbe de variation observée n'est qu'une courbe d'erreurs, et ces erreurs elles-mêmes résultent des changements de forme et de dimensions qui affectent les chromosomes au cours de la division, changements dont les conséquences sont particulièrement graves lorsqu'il s'agit d'éléments très petits situés à la limite du pouvoir résolvant de nos microscopes.

B. *Hétérochromosomes.* La variation numérique observée, bienqu'assez petite pour nous laisser croire à un nombre constant, est toutefois assez grande pour nous empêcher de déterminer le nombre total avec une certitude absolue, et nous ne pouvons donc accepter sur ce point les affirmations de Yamashina: «The number of chromosomes... was found to be 78 in the spermatogonial cell and 77 in the oogonial cell with no exception in every of them.» Une paire d'hétérochromosomes ne peut être mise en évidence que si cette paire se trouve parmi les plus grands chromosomes, ceux-ci devant être morphologiquement bien individualisés; or, cette dernière condition est réalisée chez le Poulet: dans toutes les cinèses que nous avons examinées, il est sans exception possible de reconnaître chacune des six plus grandes paires. Chez la femelle, la cinquième paire n'est représentée que par un petit métacentrique (*z*) (Fig. 1–3) qu'on trouve en deux exemplaires chez le mâle (Fig. 4–6). Les chromosomes de la cinquième paire, tout en étant à peu près de la même longueur totale que ceux de la quatrième, s'en distinguent nettement par la position médiane de leur centromère, alors que la sixième paire est beaucoup plus petite.

Tout en reconnaissant la validité des critiques de Matthey relatives à l'identification des hétérochromosomes, nous croyons cependant que chez le Poulet les caractères morphologiques des 6 plus grandes paires rendent leur identification si peu douteuse, que la conclusion de Yamashina est ici pleinement justifiée: c'est la cinquième paire, formée de métacentriques de taille moyenne, qui représente les chromosomes *Z*. Par contre il n'est pas possible de décider si la digamétie est de type *Z-O* ou *Z-W*.

*Summary*

The chromosomes of the fowl were studied with the aid of Makino's and Nishimura's water pretreatment squash technique, modified by Matthey, in embryonic spleen and gonads of both sexes. The number of chromosomes was found to be about 78; the numerical variations are to be ascribed to technical difficulties, caused by the extremely small size of the microchromosomes, rather than to an unchromosomelike behaviour of the latter, as was supposed by Newcomer and Brant. As to the exact number of chromosomes, we consider its determination beyond the possibilities of cytology. The 5th largest pair of the male, represented by a single element in the female, could be identified as the sex chromosome pair, in accordance with the findings of Yamashina. The digamety might be of the *Z-O* or *Z-W* type.

## Corrigendum

J. Mayer and Claudine Y. Zighera: *Fat Metabolism in Various Forms of Experimental Obesity. VI. Instantaneous Lipogenesis in Hypothalamic Obese Mice*, Exper. *11*, fasc. 9, 358 (1955).

In the table entitled "$C^{14}$-acetate Incorporation into Carcass and Liver Fatty Acids in Hypothalamic Obese Mice and Controls", the total $C^{14}$ incorporation for non-fasted, non-obese animals should be 370 $\pm$ 56 (instead of 3705 $\pm$ 561).

Die Forschungslaboratorien der Sandoz A.G. haben einen entscheidenden Anteil an der Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung der herzwirksamen Glykoside und leisteten wesentliche Beiträge zu deren pharmakologischen Erforschung.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten resultierten für die Therapie der Herzkrankheiten folgende Spezialpräparate:

Acylanid
Cedilanid
Digilanid
Scillaren
Strophosid

SANDOZ

SANDOZ A.G.

*Mit Spannung erwartet – soeben erschienen:*

LINUS PAULING

## Chemie - eine Einführung

Nach der 2. Auflage von GENERAL CHEMISTRY ins Deutsche übertragen von F. Helfferich, Göttingen. 1956. VIII, 624 Seiten mit 1 Bildnis, 191 Abbildungen, 39 Tabellen und 3, teils mehrfarbigen Tafeln. Kunststoffeinband DM 32.–.

Diese einfache, klare und exakte Einführung in die Chemie, die von den neuesten bahnbrechenden Erkenntnissen, insbesondere auf theoretischem Gebiet, ausgeht, setzt nur ein Minimum an Kenntnissen der chemischen Stoffe voraus. Die Entwicklung der chemischen Theorie in den letzten Jahrzehnten hat die geeignete Grundlage für das Studium der Chemie als Ganzes geschaffen. Das Buch ist deshalb in USA nicht nur bei den Studenten sehr beliebt, sondern auch bei Nichtchemikern, die sich über die Begriffs- und Gedankenwelt der Chemie orientieren wollen.

HANS FROMHERZ

## Physikalisch-chemisches Rechnen in Wissenschaft und Technik

1956. XII, 316 Seiten mit 40 Abbildungen. Ganzleinen DM 32.50.

Das Buch gibt den Lehrsätzen und Formeln der physikalischen Chemie Gestalt und Leben durch Anwendung auf vielerlei Probleme und Fragestellungen in Wissenschaft und Technik. Dem Studierenden der Chemie und Physik hilft es beim Einüben der Rechenmethoden der physikalischen Chemie. Dem Chemiker, Physiker, Chemie-Ingenieur und Chemotechniker in der Praxis dient es als Merkbuch und Gebrauchsanweisung für die unzähligen Anwendungen der physikalischen Chemie in der Technik. Dem wissenschaftlich arbeitenden Chemiker, Physiker und Mediziner will es ein zeitsparendes Nachschlage- und Kontrollbuch sein für immer wiederkehrende typische Rechenverfahren in der physikalischen Chemie.

*Prospekte mit Inhaltsübersicht und Probeseite senden wir Ihnen auf Verlangen kostenlos zu.*

VERLAG CHEMIE · GMBH · WEINHEIM / BERGSTRASSE